Ilie Diculescu Doina Onicescu

Histologie medicală

1

Editura medicală

Scanned with OKEN Scanner

Prof. dr. doc. ILIE DICULESCU
Prof. dr. doc. DOINA ONICESCU

HISTOLOGIE MEDICALĂ

VOLUMUL I

Biologia celulară și moleculară a țesuturilor

Au colaborat :
Dr. LAURENȚIU MIRCEA POPESCU
Dr. MIHAI POPESCU
Dr. CRISTINA VIDULESCU

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

CUVÎNT ÎNAINTE — 15

DIN ISTORICUL HISTOLOGIEI ROMÂNEȘTI — 24

CAPITOLUL 1 — TEHNICA MICROSCOPICĂ — dr. **Cristina Viduleseu** — 37

1.1. Importanța tehnicii microscopice — 37
1.2. Prepararea țesuturilor pentru secțiuni la parafină, colorate cu hematoxilină-eozină — 38
1.3. Metode generale de colorare — 40
1.4. Citohistochimie — 40
1.4.1. Compoziția chimică a secțiunilor de țesuturi — 40
1.4.2. Bazele chimice ale colorării — 41
1.4.3. Reacția între reactivul Schiff și grupările aldehidice — 43
1.4.4. Enzimele — 44
1.4.5. Imunocitochimie — 47
1.5. Autoradiografia — 47
1.6. Historadiografia — 48
1.7. Culturi de țesuturi și culturi de celule — 48
1.7.1. Mediile de cultură și condițiile de creștere — 49
1.7.2. Dediferențiere, linii celulare și îmbătrînirea celulară — 50
1.8. Fracționarea celulară — 50
1.8.1. Centrifugarea diferențială — 52
1.8.2. Centrifugarea în gradient de densitate — 52
1.9. Microscopie — 53
1.9.1. Microscopie optică — 53
1.9.1.1. Microscopul cu contrast de fază — 55
1.9.1.2. Microscopul de fluorescență — 55
1.9.1.3. Microscopul cu ultraviolete — 56
1.9.1.4. Microscopul cu lumină polarizată — 56
1.9.2. Microscopie electronică — 56
1.9.2.1. Microscopul electronic de transmisie — 56
1.9.2.2. Microscopul electronic de *scanning* — 58
1.9.2.3. Microscopul electronic de înalt voltaj — 59
1.9.3. Folosirea corectă a miscroscopului optic — 60
1.10. Interpretarea tridimensională a imaginilor microscopice. Stereologie și morfometrie — 62
Bibliografie selectivă — 64

CAPITOLUL 2 — CELULA — prof. dr. **I. Diculescu** și dr. **Cristina Viduleseu** — 65

2.1. Locul celulei în lumea vie — 65
2.1.1. Celula în ierarhia structurilor biologice — 65
2.1.2. Unitatea materiei vii — 66
2.1.3. Arhetipurile celulare — 66

Scanned with OKEN Scanner

2.2. Organizarea generală a celulei eukariote — 67
2.2.1. Mărime și formă — 67
2.2.2. Compartimentarea celulei și organitele celulare — 68
2.3. Membrana celulară — 71
2.3.1. Structura și arhitectura moleculară a membranei celulare — 71
2.3.2. Funcțiile membranei celulare — 75
2.3.2.1. Difuziunea și transportul prin membrană — 75
2.3.2.2. Receptorii și mesagerii — 76
2.3.2.3. Molecule și structuri implicate în interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară — 78
2.3.2.4. Domenii diferențiate ale membranei celulare — 80
2.4. Nucleul — 81
2.4.1. Nucleul, sediu al genomului — 81
2.4.2. Forma și mărimea nucleului — 82
2.4.3. Învelișul nuclear — 82
2.4.4. Nucleoplasma — 85
2.4.4.1. Cromozomii. Cariotipul. Ciclul celular — 85
2.4.4.2. Eucromatina și heterocromatina — 86
2.4.4.3. Nucleolul — 91
2.4.4.4. Alte componente ale nucleoplasmei — 93
2.5. Citoplasma — 93
2.5.1. Citoscheletul — 94
2.5.2. Centriolii și fusul mitotic — 97
2.5.3. Cilii. Flagelul — 99
2.5.4. Citosolul, sediu al moleculelor solubile — 100
2.5.5. Depozitarea de rezerve metabolice („incluziuni" citoplasmatice) — 101
2.5.5.1. Glicogenul — 101
2.5.5.2. Lipidele — 102
2.5.6. Ribozomii și sinteza de proteine — 102
2.5.6.1. Ribozomii procariotelor — 103
2.5.6.1.1. Etapele sintezei de proteine — 103
2.5.6.1.1.1. Inițierea — 103
2.5.6.1.1.2. Elongarea — 104
2.5.6.1.1.3. Terminarea — 105
2.5.6.1.1.4. Etape preparatoare — 105
2.5.6.1.2. Polizomii procariotelor — 106
2.5.6.1.2.1. Poliribozomi liberi și poliribozomi atașați — 106
2.5.6.2. Ribozomii eucariotelor — 107
2.5.6.2.1. Sinteza de proteine pe ribozomii eucariotelor — 107
2.5.6.2.2. Polizomii eucariotelor — 108
2.5.7. Reticulul endoplasmic — 110
2.5.7.1. Morfologie generală — 110
2.5.7.2. Componența moleculară și funcțiile reticulului endoplasmatic — 112
2.5.7.2.1. Fracțiunile microzomale — 112
2.5.7.2.1.1. Lipidele — 112
2.5.7.2.1.2. Proteinele — 113
2.5.8. Complexul Golgi — 117
2.5.8.1. Morfologie generală — 118
2.5.8.2. Funcții — 121
2.5.8.2.1. Transportul — 121
2.5.8.2.2. Modificarea proteinelor — 121
2.5.8.2.3. Împachetarea — 122
2.5.8.2.4. Alte funcții legate de secreție — 122
2.5.8.2.5. Funcții prezumtive — 122
2.5.9. Calea secretorie — 123
2.5.9.1. Exocitoza — 123
2.5.10. Endocitoza — 123
2.5.11. Lizozomii — 124
2.5.11.1. Organizarea lizozomilor — 124
2.5.11.2. Funcțiile lizozomilor — 125
2.5.11.2.1. Sistemul lizozomal — 125
2.5.11.2.2. Intrarea în lizozomi — 125

Scanned with OKEN Scanner

2.5.11.2.3. Soarta materialului ingerat de celulă — 126
2.5.11.2.4. Sursa enzimelor lizozomale — 127
2.5.11.2.5. Funcţii celulare speciale mediate de lizozomi — 128
2.5.11.3. Implicaţiile medicale — 128
2.5.12. Sistemele celulare ale conversiei de energie — 129
2.5.12.1. Sistemele energetice ale celulei animale — 129
2.5.12.1.1. Glicoliza — 130
2.5.12.1.2. Fosforilarea oxidativă — 130
2.5.12.2. Mitocondriile — 131
2.5.13. Peroxizomii — 136
Bibliografie selectivă — 137

CAPITOLUL 3 — MULTICELULARITATEA ORGANISMULUI UMAN — 138

3.1. Generalităţi — prof. dr. **I. Diculescu** — 138
3.2. Diferenţierea şi controlul expresiei genetice — prof. dr. **I. Diculescu** — 139
3.2.1. Ce este diferenţierea? — 139
3.2.2. Unitatea genomului şi diversitatea expresiei sale — 139
3.2.3. Controlul expresiei genetice — 140
3.2.4. Menţinerea stării de diferenţiere — 142
3.2.5. Interrelaţia citoplasmă-material genetic — 142
3.3. Proliferarea celulară şi populaţiile de celule — prof. dr. **I. Diculescu** — 143
3.3.1. Ce este proliferarea celulară? — 143
3.3.2. Populaţiile de celule — 146
3.3.3. Conceptul de „celulă-stem" — 147
3.4. Factorii de creştere mitogeni — prof. dr. **I. Diculescu** — 149
3.4.1. Ce se înţelege prin factori de creştere? — 149
3.4.2. Principalii factori de creştere — 149
3.4.2.1. Factorul de creştere epidermic — 149
3.4.2.2. Factorul de creştere derivat din plachetele sanguine — 150
3.4.2.3. Factorul de creştere a fibroblastelor — 150
3.4.2.4. Factorul de creştere a celulelor endoteliale — 150
3.4.2.5. Factorul de creştere astrocitar — 150
3.4.2.6. Factorul de creştere extras din ochi — 151
3.4.2.7. Factorul de creştere extras din cartilaj — 151
3.4.3. Mecanismul de acţiune *in vitro* a factorilor de creştere — 151
3.4.3.1. Fosforilarea receptorului — 152
3.4.3.2. Endocitoza complexului receptor + factor de creştere — 152
3.4.3.3. Factori de competenţă şi factori de progresiune — 152
3.4.3.4. Controlul ciclului celular — 152
3.4.4. Efectul *in vivo* al factorilor de creştere — 153
3.4.4.1. Rolul şi efectul *in vivo* al EGF — 153
3.4.4.2. Efectele *in vivo* ale TGF — 153
3.4.4.3. Rolul PDGF în patogenia aterosclerozei — 153
3.5. Oncogenele — prof. dr. **I. Diculescu** — 154
3.5.1. Generalităţi — 154
3.5.2. Retrovirusurile — 154
3.5.3. Virusurile tumorale ADN — 155
3.5.4. Mecanismele de acţiune a oncogenelor — 156
3.5.4.1. Fosforilarea — 156
3.5.4.2. Iniţierea sintezei de ADN — 156
3.5.4.3. Reglarea transcripţiei — 156
3.6. Matricea extracelulară — dr. **Cristina Vidulescu** şi prof. dr. **I. Diculescu** — 158
3.6.1. Generalităţi — 158
3.6.2. Principalele molecule organice ale matricei extracelulare — 159
3.6.2.1. Colagenul — 159
3.6.2.2. Glicoproteinele — 159
3.6.2.2.1. Fibronectina — 160
3.6.2.2.2. Laminina — 162

Scanned with OKEN Scanner

3.6.2.2.3. Condronectina — 162
3.6.2.2.4. Factorii serici de etalare a celulelor — 163
3.6.2.2.5. Uvomorulina — 163
3.6.2.2.6. Lectinele extracelulare — 163
3.6.2.3. Proteoglicanii — 165
3.6.3. Reglarea cantității moleculelor extracelulare — 169
3.7. Adezivitatea și morfogeneza — dr. **Cristina Vidulescu** — 170
3.7.1. Principalele evenimente ale morfogenezei — 170
3.7.2. Moleculele adezivității celulă-celulă — 171
3.7.3. Interacțiunile celulă-celulă în morfogeneză — 172
3.7.4. Interacțiunile celulă-matrice extracelulară și migrarea celulară — 175
3.7.4.1. Migrarea interstițială — 175
3.7.4.2. Migrarea prin sîngele circulant — 178
3.8. Comunicarea intercelulară — prof. dr. **I. Diculescu** — 179
3.8.1. Generalități — 179
3.8.2. Receptorii — 180
3.8.2.1. Clasificarea receptorilor — 181
3.8.2.2. Mecanismul de acțiune a receptorilor — 181
3.8.2.3. Patologia receptorilor — 185
3.8.2.4. Receptorii și cancerul — 185
3.8.3. Citokinele — 186
3.8.3.1. Interleukina I — 186
3.8.3.2. Interleukina II — 186
3.9. Bazele imunogenezei — prof. dr. **I. Diculescu** — 186
3.9.1. Generalități — 186
3.9.2. Componentele sistemului imun — 187
3.9.2.1. Componenta celulară — 187
3.9.2.2. Componenta genetică și moleculară — 187
3.9.2.2.1. Imunogenii (antigenii) — 187
3.9.2.2.2. Antigenii de histocompatibilitate — 188
3.9.3. Imunoglobulinele (anticorpii) — 193
3.9.3.1. Imunoglobulina G (IgG) — 195
3.9.3.2. Imunoglobulina A (IgA) — 195
3.9.3.3. Imunoglobulina M (IgM) — 196
3.9.3.4. Imunoglobulina D (IgD) — 196
3.9.3.5. Imunoglobulina E (IgE) — 196
3.10. Țesuturile — conceptul și clasificarea — 196
Bibliografie selectivă — 201

CAPITOLUL 4 — ȚESUTURILE EPITELIALE — prof. dr. **I. Diculescu** — 202

4.1. Generalități — 202
4.1.2. Nomenclatură și etimologie — 203
4.1.3. Histogeneza — 203
4.1.3.1. Ectodermul — 203
4.1.3.2. Mezodermul — 203
4.1.3.3. Endodermul — 204
4.1.4. Definiție — 204
4.2. Clasificarea epiteliilor — 204
4.2.1. Epiteliile de acoperire — 205
4.2.1.1. Epiteliile simple — 206
4.2.1.2. Epiteliile stratificate — 207
4.2.1.2.1. Epiteliul stratificat pavimentos keratinizat — 207
4.2.1.2.2. Epiteliul stratificat pavimentos mucos — 209
4.2.1.2.3. Epiteliul stratificat columnar — 210
4.2.1.2.4. Epiteliul tranzițional — 210
4.2.1.3. Epiteliul pseudostratificat — 211
4.2.2. Epiteliile glandulare — 211
4.2.2.1. Glandele exocrine — 212
4.2.2.1.2. Glandele mixte — 213
4.2.2.1.3. Arhitectura glandelor exocrine compuse — 215

Scanned with OKEN Scanner

4.2.2.2. Glandele endocrine — 216
4.3. Caracterele generale ale țesuturilor epiteliale — 216
4.3.1. Forma celulelor — 217
4.3.2. Polaritatea tisulară — 217
4.3.3. Celularitatea — 217
4.3.4. Membrana bazală — 219
4.3.4.1. Moleculele organice din structura membranei bazale — 223
4.3.4.1.1. Colagenul de tip IV — 223
4.3.4.1.2. Proteoglicanul heparan-sulfat — 225
4.3.4.1.3. Glicoproteine — 225
4.3.4.2. Bazele moleculare ale ultrastructurii — 226
4.4. Celulele epiteliale — 227
4.4.1. Suprafața celulară — 227
4.4.2. Dispozitive joncționale intercelulare speciale — 229
4.4.2.1. Dispozitive joncționale de adezivitate — 230
4.4.2.1.1. Desmozomii — 230
4.4.2.2. Dispozitive joncționale impermeabile — 234
4.4.2.2.1. Joncțiunea strînsă — 234
4.4.2.3. Dispozitive joncționale de comunicație — 239
4.4.2.3.1. Joncțiunile de tip *gap* — 239
4.4.3. Polaritatea celulelor epiteliale — 243
4.4.3.1. Suprafața celulelor epiteliale este împărțită în domenii — 244
4.4.3.2. Zonulele occludens și polaritatea epitelială — 244
4.4.3.3. Biogeneza polarității celulei epiteliale — 245
4.4.3.4. Membrana apicală — 246
4.4.3.4.1. Microvilii — 247
4.4.3.4.1.1. Marginea striată — 248
4.4.3.4.1.2. Trama terminală — 248
4.4.3.4.1.3. Marginea în perie — 250
4.4.3.4.1.4. Stereocilii — 250
4.4.3.4.1.5. Cilii — 251
4.4.3.4.2. Domeniul latero-bazal al membranei celulare — 252
4.4.3.4.3. Polaritatea hepatocitelor — 252
4.4.3.4.3.1. Domeniul sinusoidal (perisinusoidal) — 252
4.4.3.4.3.2. Domeniul lateral — 252
4.4.3.4.3.3. Polaritatea intracelulară — 253
4.4.4. Citoplasma celulelor epiteliale — 253
4.5. Biologia generală a epiteliilor — 258
4.5.1. Nutriția și inervația — 259
4.5.2. Reînnoirea celulelor epiteliale — 259
4.5.3. Metaplazia — 259
4.5.4. Controlul activității glandulare — 259
4.6. Bazele moleculare ale biologiei unor țesuturi epiteliale — 261
4.6.1. Keratinogeneza — 261
4.6.1.1. Biogeneza epidermului — 261
4.6.1.2. Diferențierea keratinocitelor — 263
4.6.1.2.1. Keratina — 263
4.6.1.2.2. Filagrina — 263
4.6.1.2.3. Matricea extracelulară — 265
4.6.2. Transportul epitelial — 265
4.6.2.1. Celulele care transportă ioni — 265
4.6.2.2. Transportul moleculelor exogene complexe — 268
4.6.2.2.1. Endocitoza mediată de receptori — 268
4.6.2.3. Transportul intra- și transcelular al proteinelor secretate de hepatocite — 272
4.6.2.3.1. Calea intracelulară — 273
4.6.2.3.2. Calea transcelulară — 275
4.6.3. Secreția celulară — 275
4.6.3.1. Celulele secretoare de proteine — 275
4.6.3.2. Celulele secretoare de polipeptide și amine biogene — 278
4.6.3.3. Celulele secretoare de glicoproteine — 280
4.6.3.4. Celulele secretoare de steroizi — 281
4.6.4. Epiteliile și imunitatea — 282
4.6.4.1. Structura IgA serice și IgA secretorii — 283

Scanned with OKEN Scanner

4.6.4.1.1. Dimerul $(IgA)_2$ — 284
4.6.4.1.2. Componenta secretorie (CS) — 284
4.6.4.2. Transportul sIgA și sIgM — 285
4.6.4.3. Rolul sIgA în imunitatea de suprafață — 285
Bibliografie selectivă — 286

CAPITOLUL 5 — ȚESUTURILE CONJUNCTIVE (TEXTUS CONNECTIVI)
prof. dr. **Doina Onicescu** — 288

5.1. Definiție, localizare, histogeneză, alcătuire generală — 288
5.2. Celulele conjunctive propriu-zise (Cellulae textus connectivi) — 289
5.2.1. Fibroblastul (Fibroblastus) — 289
5.2.1.1. Particularități morfologice — 290
5.2.1.2. Funcții — 291
5.2.2. Mastocitul (Basophilus textus) — 294
5.2.2.1. Originea mastocitelor — 294
5.2.2.2. Funcția — 295
5.2.3. Macrofagele (Macrophagocytus) — 297
5.2.3.1. Originea macrofagelor — 297
5.2.3.2. Particularități morfologice — 298
5.2.3.3. Citofiziologia macrofagelor — 299
5.2.3.3.1. Fagocitoza specifică neimunologică sau neimunospecifică — 300
5.2.3.3.2. Fagocitoza specifică imunologică sau imunospecifică — 300
5.2.4. Plasmocitul (Plasmocytus) — 302
5.2.4.1. Particularități morfologice — 302
5.2.5. Leucocitele — 304
5.2.6. Celula endotelială — 304
5.2.6.1. Particularități morfologice — 305
5.2.6.2. Funcții — 306
5.3. Matricea conjunctivă — 307
5.3.1. Fibrele de colagen (Fibre collagenosa) — 307
5.3.1.1. Colagenul tip I — 308
5.3.1.2. Colagenul tip II — 308
5.3.1.3. Colagenul tip III — 308
5.3.1.4. Colagenul tip IV — 309
5.3.1.5. Colagenul tip V — 309
5.3.1.6. Fomarea moleculelor de colagen (fibringeneza) — 311
5.3.1.7. Funcțiile colagenului — 313
5.3.2. Fibrele elastice (Fibrae elasticae) — 314
5.3.2.1. Elastina — 315
5.3.2.2. Fibrele oxitalanice — 316
5.3.3. Fibrele de reticulină (Fibrae reticularis) — 317
5.3.4. Modificări ale moleculei de colagen și elastină în condiții fiziologice și patologice — 318
5.3.5. Substanța fundamentală — 319
5.3.5.1. Glicozaminoglicanii — 319
5.3.5.2. Glicoproteinele structurale — 322
5.4. Tipuri de țesuturi conjunctive — 323
5.4.1. Țesuturi conjunctive propriu-zise — 324
5.4.1.1. Țesutul conjunctiv lax sau areolar (Textus connectivus laxus) — 324
5.4.1.2. Țesutul conjunctiv dens (Textus connectivus fibrosus) — 324
5.4.1.2.1. Tendonul (Tendo) — 325
5.4.1.2.2. Aponevrozele — 326
5.4.1.2.3. Țesutul conjunctiv lamelar (Textus connectivus lamellaris) — 326
5.4.2. Țesuturi conjunctive cu funcții speciale — 327
5.4.2.1. Țesutul conjunctiv elastic (Textus connectivus elasticum) — 327
5.4.2.2. Țesutul conjunctiv reticular (Textus connectivus reticularis) — 327
5.4.2.3. Țesutul conjunctiv mucos (Textus connectivus mucosum) — 328
5.4.2.4. Țesutul adipos (Textus adiposus) — 328
5.4.2.4.1. Țesutul adipos alb-galben — 329
5.4.2.4.2. Țesutul adipos brun — 332
Bibliografie selectivă. — 334

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 6 — ȚESUTURILE DE SUSȚINERE (DE SUPORT) — prof. dr. **Doina Oniceseu** —335
6.1. Țesuturile cartilaginoase (Textus cartilagineus) — 335
6.1.1. Cartilajul hialin (Cartilago hyalina) — 335
6.1.1.1. Particularități morfologice — 335
6.1.1.2. Creșterea cartilajului — 338
6.1.1.3. Nutriția cartilajului — 338
6.1.1.4. Modificări în raport cu vîrsta — 339
6.1.2. Cartilajul elastic (Cartilago elastica) — 339
6.1.3. Cartilajul fibros sau fibrocartilajul (Cartilago fibrosa) — 340
6.2. Țesuturile osoase (Textus osseus) — 341
6.2.1. Generalități. Definiție — 341
6.2.2. Structura țesutului osos — 341
6.2.2.1. Celulele osoase — 341
6.2.2.1.1. Osteoblastul (Osteoblastus) — 342
6.2.2.1.2. Osteocitul (Osteocytus) — 342
6.2.2.1.3. Osteoclastul — 342
6.2.2.2. Matricea osoasă — 344
6.2.3. Tipuri de țesut osos — 344
6.2.3.1. Țesutul osos haversian (compact) — 344
6.2.3.2. Țesutul osos spongios — 348
6.2.4. Osul ca organ — 348
6.2.4.1. Tipuri de oase — 348
6.2.4.2. Periostul (Periosteum) — 349
6.2.4.3. Endostul (Endosteum) — 349
6.2.4.4. Măduva oasoasă — 349
6.2.4.5. Nutriția osului — 349
6.2.4.6. Inervația osului — 350
6.2.5. Osteogeneza (osificarea, formarea osului) — 350
6.2.5.1. Osificarea intramembranoasă (Osteogenesis membranacea) — 350
6.2.5.2. Osificarea intracartilaginoasă (encondrală) (Osteogenesis cartilaginea) — 351
6.2.5.2.1. Osificarea encondrală embrionară și fetală — 351
6.2.6. Creșterea post-natală a oaselor lungi — 354
6.2.6.1. Zona cartilajului de rezervă (în repaus) — 355
6.2.6.2. Zona de proliferare (de multiplicare a cartilajului) — 355
6.2.6.3. Zona de maturare (hipertrofiere) a cartilajului — 356
6.2.6.4. Zona de calcifiere a cartilajului — 356
6.2.6.5. Zona de osificare — 356
6.2.6.6. Osificarea mixtă — 357
6.2.7. Remodelarea (remanierea) osului — 357
6.2.7.1. Remodelarea internă — 358
6.2.7.2. Remodelarea externă — 359
6.2.8. Factorii care influențează metabolismul osului și procesul de osteogeneză — 360
6.2.8.1. Vitaminele — 360
6.2.8.2. Hormonii — 360
6.2.8.3. Tulburări de sinteză și de mineralizare a matricei — 361
6.2.9. Repararea fracturilor — 362
6.2.10. Transplantul osos — 363
6.2.11. Articulațiile osoase — 363
6.2.11.1. Diartrozele — 364
6.2.11.1.1. Structura histologică a elementelor componente ale unei articulații mobile — 364
6.2.11.2. Sinartrozele — 368
Bibliografie selectivă — 368
CAPITOLUL 7 — SÎNGELE (Sanguis) — prof. dr. **Doina Oniceseu** — 369
7.1. Definiție. Generalități — 369
7.2. Plasma sanguină (Plasma sanguinis) — 369
7.3. Celulele sanguine — 370
7.3.1. Leucocitele — 371
7.3.1.1. Leucocitele granulare — 372
7.3.1.1.1. Neutrofilul (Granulocytus neutrophylus) — 372
7.3.1.1.1.1. Forma celulei — 372
7.3.1.1.1.2. Structura și ultrastructura neutrofilului — 372

Scanned with OKEN Scanner

7.3.1.1.1.3. Funcțiile neutrofilului — 375
7.3.1.1.2. Eozinofilul (Granulocytus eosinophylus) — 379
7.3.1.1.2.1. Structura și ultrastructura eozinofilului — 379
7.3.1.1.2.2. Funcțiile eozinofilului — 380
7.3.1.1.3. Bazofilul (Granulocytus basophylus) — 381
7.3.1.1.3.1. Forma celulei — 382
7.3.1.1.3.2. Structura și ultrastructura bazofilului — 382
7.3.1.1.3.3. Funcțiile bazofilului — 383
7.3.1.2. Leucocitele agranulare — 383
7.3.1.2.1. Limfocitul (Lymphocytus) — 383
7.3.1.2.1.1. Forma celulei — 383
7.3.1.2.1.2. Structura și ultrastructura limfocitului — 383
7.3.1.2.1.3. Funcțiile limfocitului — 384
7.3.1.2.1.4. Limfocitele B — 385
7.3.1.2.1.5. Limfocitele T — 388
7.3.1.2.2. Monocitul (Monocytus) — 393
7.3.1.2.2.1. Forma celulei — 393
7.3.1.2.2.2. Structura și ultrastructura monocitului — 393
7.3.1.2.2.3. Funcțiile monocitului — 399
7.3.2. Eritrocitul = hematia (Erytrocytus) — 399
7.3.2.1. Forma eritrocitului — 399
7.3.2.1.1. Forme de eritrocite — 399
7.3.2.2. Structura și ultrastructura eritrocitului — 400
7.3.2.3. Funcțiile eritrocitului — 406
7.3.3. Placheta sanguină = trombocitul (Thrombocytus) — 407
7.3.3.1. Forma celulei — 407
7.3.3.2. Structura și ultrastructura plachetei sanguine — 407
7.3.3.3. Funcțiile trombocitului — 408
7.3.3.3.1. Alte funcții ale plachetelor sanguine — 411
7.4. Hemopoieza (Haemopoesis) — 412
7.4.1. Generalități — 412
7.4.2. Granulocitopoieza (Granulocytopoesis) — 414
7.4.3. Limfocitopoieza (Lymphocytopoesis) — 416
7.4.4. Monocitopoieza (Monocytopoesis) — 417
7.4.5. Eritropoieza — 417
7.4.6. Trombocitopoieza — 421
7.4.7. Hemopoieza intrauterină — 426
Bibliografie selectivă — 427

CAPITOLUL 8 — ȚESUTURILE MUSCULARE — 428

8.1. Introducere. Clasificare — dr. **Laurențiu M. Popescu** — 428
8.2. Țesutul muscular striat scheletic — 428
8.2.1. Fibra musculară striată scheletică — 430
8.2.1.1. Generalități. Formă, dimensiuni, dispoziție — 430
8.2.1.1.1. Forma — 430
8.2.1.1.2. Dimensiuni — 430
8.2.1.1.3. Lungimea — 430
8.2.1.1.4. Grosimea — 431
8.2.1.1.5. Dispoziția fibrelor musculare striate (Structura mușchiului scheletic ca organ) — 432
8.2.1.2. Structura și ultrastructura fibrei musculare scheletice — 435
8.2.1.2.1. Învelișul celular (sarcolema) — 435
8.2.1.2.2. Nucleii — 441
8.2.1.2.3. Organite comune și incluziuni — 442
8.2.1.2.4. Organite specifice — 444
8.2.1.2.4.1. Miofibrila striată și mecanismul contracției — 444
8.2.1.2.4.2. Reticulul sarcoplasmic și cuplarea excitație-contracție — 467
8.2.1.3. Heterogenitatea fibrelor musculare scheletice și clasificarea lor — 473
8.2.1.3.1. Fibrele musculare roșii — 476
8.2.1.3.2. Fibrele musculare albe — 478
8.2.1.4. Histogeneza fibrelor musculare scheletice — 480

Scanned with OKEN Scanner

8.2.1.5. Regenerarea fibrelor musculare scheletice — 481
8.2.1.6. Joncțiunea dintre fibrele musculare scheletice și tendon — 485
8.2.1.7. Inervația motorie a fibrelor musculare scheletice — 487
8.2.1.7.1. Unitatea motorie — 487
8.2.1.7.2. Placa motorie (placa terminală sau joncțiunea mio-neurală — 487
8.2.1.8. Inervația senzitivă a fibrelor musculare scheletice. Fusuri neuromusculare — 490
8.2.1.8.1. Fibrele intrafuzale — 491
8.2.1.8.2. Terminații nervoase în fusul neuromuscular — 491
8.3. Țesutul muscular cardiac — dr. **Mihai Popescu** — 493
8.3.1. Miocardocitele lucrătoare ventriculare — 494
8.3.1.1. Ultrastructura miocardocitelor lucrătoare ventriculare — 495
8.3.1.1.1. Învelișul celular (sarcolema) — 495
8.3.1.1.2. Discurile intercalare — 497
8.3.1.1.3. Sarcoplasma, organitele celulare comune, incluziuni — 500
8.3.1.1.4. Materialul contractil — 502
8.3.1.1.5. Reticulul sarcoplasmic (RS) și cuplarea excitație-contracție — 503
8.3.2. Miocardocitele lucrătoare atriale — 516
8.3.3. Miocardocitele sistemului excitoconductor — 517
8.3.3.1. Organizarea histologică a sistemului excitoconductor cardiac — 520
8.3.4. Spațiul extracelular — 523
8.3.5. Adaptarea și regenerarea miocardului — 524
8.3.6. Histogeneza țesutului muscular cardiac — 524
8.4. Țesutul muscular neted — dr. **Laurențiu M. Popescu** — 525
8.4.1. Generalități — 525
8.4.1.1. Răspîndire — 525
8.4.1.2. Dispoziția fibrelor musculare netede — 525
8.4.1.3. Spațiul extracelular (matricea extracelulară) — 526
8.4.2. Structura și ultrastructura fibrei musculare netede — 526
8.4.2.1. Forma — 526
8.4.2.2. Dimensiunile — 526
8.4.2.3. Organizarea generală — 527
8.4.2.4. Nucleul — 527
8.4.2.5. Învelișul celular (sarcolema) — 529
8.4.2.5.1. Caveolele — 529
8.4.2.5.2. Ariile dense — 530
8.4.2.5.3. Joncțiunile intracelulare — 531
8.4.2.6. Sarcoplasma, organitele comune și incluziunile — 532
8.4.2.6.1. Mitocondriile — 534
8.4.2.6.2. Alte organite comune — 535
8.4.2.6.3. Incluziuni — 536
8.4.2.7. Aparatul contractil — 536
8.4.2.7.1. Filamentele groase (de miozină) — 536
8.4.2.7.2. Filamentele subțiri (de actină) — 537
8.4.2.7.3. Elementele citoscheletale. Corpii denși (leiozomii) și filamentele intermediare — 538
8.4.2.8. Mecanismul contracției fibrei musculare netede — 540
Bibliografie selectivă — 541

CAPITOLUL 9 — ȚESUTUL NERVOS ȘI SISTEMUL NERVOS — 543 — prof. dr. **I. Diculescu**

9.1. Noțiuni generale — 543
9.1.1. Filogeneza — 543
9.1.2. Sistemul nervos central și periferic — 544
9.1.3. Embriogeneza — 545
9.1.4. Histogeneza țesutului nervos — 545
9.1.5. Țesutul nervos — 550
9.2. Neuronul (Neuronum sau neurocytus) — 551
9.2.1. Structura generală a celulei nervoase — 551
9.2.2. Corpul celulei nervoase — 555
9.2.2.1. Membrana — 556
9.2.2.2. Nucleul — 556

Scanned with OKEN Scanner

9.2.1.3. Reticulul endoplasmic rugos — 557
9.2.1.4. Aparatul Golgi — 557
9.2.1.5. Mitocondriile — 557
9.2.1.6. Matricea — 557
9.2.1.7. Incluziuni — 565
9.2.1.8. Veziculele acoperite — 565
9.2.3. Dendritele (Dendritum) — 566
9.2.4. Axonul — 567
9.2.5. Sinapsele (Sinapsis interneuronalis) — 569
9.3. Nevrogliile (Neuroglia) — 574
9.3.1. Astrocitele — 575
9.3.1.1. Astrocitele protoplasmatice — 575
9.3.1.2. Astrocitele fibroase — 576
9.3.2. Oligodendrocitele — 576
9.3.3. Microgliile — 577
9.3.4. Celulele ependimare — 578
9.3.5. Nevrogliile sistemului nervos periferic — 578
9.3.6. Histofiziologia nevrogliilor — 578
9.3.6.1. Proprietățile fiziologice ale nevrogliilor — 579
9.3.6.2. Interacțiunile dintre nevroglii și neuroni — 580
9.4. Fibrele nervoase (Neurofibra) — 582
9.4.1. Tipurile de fibre nervoase — 582
9.4.1.1. Fibrele mielinice — 585
9.4.1.1.1. Mielinogeneza — 586
9.4.1.1.1.1. Compoziția moleculară a mielinei — 587
9.4.1.1.2. Celulele Schwann — 592
9.4.1.2. Fibrele nemielinice — 592
9.5. Histofiziologia țesutului nervos — 594
9.5.1. Bazele moleculare ale transmiterii impulsului nervos — 595
9.5.2. Neurotransmițătorii — 597
9.5.3. Receptorul pentru acetilcolină — 603
9.5.4. Bazele celulare ale învățării și memorizării — 606
9.5.5. Bazele celulare ale dezvoltării țesutului nervos — 609
9.5.5.1. Encefalinele și dezvoltarea țesutului nervos — 611
9.5.5.2. Moleculele adezivității celulelor nervoase — 612
9.5.5.3. Creșterea axonilor și formarea căilor nervoase — 614
9.5.5.4. Structura internă a neuriților în cursul histogenezei lor — 616
9.5.5.5. Factorii neurotrofici — 619
9.5.5.5.1. Factorul de creștere nervos (FCN) — 619
9.5.5.5.2. Alți factori neurotrofici — 620
9.5.5.6. Limitele neurogenezei la om — 621
9.5.6. Degenerarea și regenerarea — 622
9.5.7. Bazele ultrastructurale ale transportului axonal — 627
9.6. Sistemul nervos periferic — 630
9.6.1. Generalități — 630
9.6.2. Ganglionii craniospinali — 631
9.6.3. Ganglionii autonomi — 633
9.6.4. Nervii — 635
9.7. Organizarea generală a țesutului nervos în sistemul nervos central — 637
9.7.1. Substanța cenușie și substanța albă — 637
9.7.1.1. Substanța cenușie — 638
9.7.1.2. Substanța albă — 639
9.7.2. Nucleii cerebrali sau grupele de neuroni centrali — 639
9.7.3. Scoarța cerebrală — 640
9.7.3.1. Generalități — 640
9.7.3.2. Histogeneza — 641
9.7.3.3. Structura microscopică a scoarței cerebrale — 643
9.7.3.3.1. Organizarea laminară — 645
9.7.3.3.2. Organizarea modulară — 651
9.7.3.4. Concluzii — 657
9.7.4. Scoarța cerebelului — 657

Scanned with OKEN Scanner

9.7.4.1. Generalităţi — 657
9.7.4.2. Structura microscopică a scoarţei cerebeloase — 657
9.7.4.2.1. Celulele Purkinje — 660
9.7.4.2.2. Fibrele agăţătoare — 661
9.7.4.2.3. Fibrele muşchioase — 662
9.7.4.2.4. Interneuronii — 663
9.7.4.2.5. Circuitele nervoase — 664
9.7.4.3. Funcţiile scoarţei cerebeloase — 666
9.7.5. Meningele — 669
9.7.5.1. Dura mater — 669
9.7.5.2. Arahnoida — 669
9.7.5.3. Pia mater — 670
9.7.6. Vascularizaţia sistemului nervos central — 670
9.7.6.1. Conceptul de barieră hematoencefalică — 671
9.7.6.2. Cum traversează substanţele nutritive bariera hematoencefalică? — 672
9.7.6.3. Implicaţiile medicale — 674
9.7.6.4. Fluxul sanguin şi activitatea cerebrală — 675
9.7.7. Plexurile coroide şi lichidul cerebrospinal — 678
9.7.7.1. Plexurile coroide *(Tela coroidea)* — 678
9.7.7.2. Lichidul cerebrospinal — 678
9.8. Sistemul nervos ca parte a unei totalităţi — 680
9.8.1. Sistemul nervos şi imunogeneza — 680
9.8.2. Bazele moleculare ale comunicării intercelulare — 682
9.8.2.1. Mecanismele de comunicare intraneuronală — 684
9.8.2.1.1. Bazele moleculare ale acţiunii mesagerilor în neuroni — 684
9.8.2.1.2. Fosforilarea proteinelor neuronale — 686
9.8.2.1.3. Sistemul kinază CaM/fosfatază — 688
9.8.2.1.4. Factorul de creştere nervos şi fosforilazele — 689
9.8.2.1.5. Biologia unor fosfoproteine — 690
Bibliografie selectivă — 693
Index alfabetic — 695

Scanned with OKEN Scanner

CUVÎNT ÎNAINTE

Generația mea, care pătrundea în domeniul științelor biologice la începutul anilor '40, păstrează despre perioada studenției cel puțin două amintiri, și anume că: (1) studentul este capabil să memoreze un număr incredibil de mare de fapte disparate, adeseori fără legătură directă cu subiectele curriculum-ului promovării în activitatea medicală; mai mult, predarea unor noțiuni supracondensate și necoerente a creat întotdeauna confuzii și nu a stîrnit niciodată un interes real pentru tema tratată; (2) unii dintre noi ne aflăm sub fascinația unor lecturi ca „Omul ființă necunoscută", cartea lui Alexis Carrel în care se evoca interdependența fenomenelor fizice cu viața psihică sau a celor prilejuite de cărțile lui J.B.S. Haldane și ale lui J.D. Bernal, care preziceau că științele biologice vor trăi foarte curînd vîrsta lor de aur. Puțini studenți sesizau importanța sau finalitatea efortului de memorizare și mai puțini întrezăreau o atît de rapidă maturizare a științelor biomedicale. Avînd în minte o experiență atît de contrastantă cu „bila de cristal" a propriei formații, în cartea de față vom căuta ori de cîte ori va fi posibil să surprindem unitatea fenomenelor la nivelul de organizare celulară și tisulară, încercînd, pe cît este cu putință, să depășim barierele artificiale dintre disciplinele biomedicale fundamentale, stabilite încă din secolul trecut și impuse atît de restricțiile practicilor tehnologice cît și de limitele umane ale cuprinderii teoretice.

Histologia este locul de întîlnire a biochimiei, fiziologiei și anatomiei. Enzimele, acizii nucleici, fosfoproteinele, neuropeptidele și alte molecule nu plutesc la întîmplare în soluții: nu sîntem un fel de „bulion primitiv" acoperit de un înveliș denumit piele. Moleculele sînt organizate cu mare precizie în interiorul celulelor, sub formă de organite discrete, care pot fi observate la microscopul electronic și care îndeplinesc funcții precise. Celulele la rîndul lor sînt aranjate în rețele intricate, observabile la microscopul optic, a căror dispoziție în spațiu este necesară pentru ca organismul să poată funcționa conform caracteristicilor pe care i le conferă compoziția sa moleculară. Aceste aranjamente determină atît organizarea cît și modul de funcționare a tuturor organelor și sistemelor ca de exemplu a membrelor, a creierului și a organelor interne. Nu putem înțelege corpul vertebratelor fără a lua în considerație acest nivel intermediar al organizării, fără a studia populațiile de celule, alcătuirea lor,

și va ajunge să țeasă treptat ceea ce numim însușirea metodei de cunoaștere biologică experimentală.

Cel mai adesea obiectivul principal și mai frecvent tangibil al disciplinelor biomedicale fundamentale constă în însușirea și memorarea faptelor, a metodelor și nomenclaturii care fac obiectul de studiu al specialității respective ca și recunoașterea lor.

Acest obiectiv se află la baza învățămîntului medical tradițional și el corespunde vocației instructive și formative pe care o au științele așa-zis preclinice. Mai mult, această orientare corespunde demersului științific experimantal preconizat de Cl. Bernard, care, de peste 100 de ani și-a extins aplicativitatea în toate domeniile cunoașterii umane, în științele fizice, biologice și ale celor umanistice.

În conformitate cu acest demers ordinea logică a raționamentului experimental este: (1) observația sugerează (2) ideea sau ipoteza, care conduce la rîndul ei la (3) experiența după care este evaluată ideea. În concordanță cu acest demers, histologia clasică urmărește ca studentul să observe, să memorizeze, să-și imagineze și să recunoască nivelul celular și tisular de organizare a corpului omenesc — cu alte cuvinte organizarea generală a celulei, a celor patru țesuturi fundamentale și a celor circa 200 de tipuri de celule care compun organele și aparatele. Acest efort este necesar atît pentru a înțelege legitățile biologice în măsura necesară abordării problematicii patologiei umane, cît și pentru că în practica medicală trebuie să știi și ce tehnologii microscopice pot fi eficiente, cînd și cum pot fi practicate.

Trebuie observat că această concepție despre histologie (ca de altfel

și despre celelalte discipline biomedicale fundamentale) apare astăzi nesatisfăcătoare atît din punct de vedere practic cît și din punct de vedere teoretic.

Explozia tehnologică de care au beneficiat științele biomedicale în ultimii circa 30 de ani și enorma acumulare de fapte în fiecare domeniu al științelor particulare fac ca în prezent cea mai mare parte dintre cei ce studiază histologia (și mai ales profesioniștii) să devină conștienți de faptul că pe secțiunile colorate cu hematoxilină-eozină, de exemplu din mucoasa intestinală, sau pe un frotiu de sînge colorat cu Giemsa, celulele din imaginile microscopice sînt în realitate numai niște cadavre colorate strălucitor. Este de dorit ca histologia actuală să devină puntea de legătură dintre histologia descriptivă de ieri și biologia tisulară *de astăzi. De pildă, luînd un exemplu vom constata că există o imagine a limfocitului în histologia clasică, alte imagini la microscopul de contrast de fază și la microscopul de interferență, la microscopul electronic, la microscopul de baleiaj, la microscopul electronic de înalt voltaj. Altă imagine ne oferă rezonanța magnetică nucleară adaptată la citologie sau analiza spectrofotometrică (în vizibil sau în ultraviolet), historadiografia, histoenzimologia, imunohistochimia; la crearea unei imagini globale, își aduc contribuția specialistul în culturi de celule, embriologul, imunologul, biochimistul și chiar biomatematicianul. Adesea, diferitele puncte de vedere nu sînt confruntate și fiecare specialist se mulțumește cu propria sa tehnică. Integrarea tuturor datelor într-un model global poate dezvălui realități ascunse de abordarea din unghiul unei singure specialități.*

Formele, dimensiunile și culorile celulelor din secțiunile histologice pot fi explicate pe baza ultrastructurii lor sau a orgnizării moleculare ce este corelată cu fiziologia celulară sau tisulară. În definitiv este știut demult că strategia cunoașterii științifice biomedicale *constă în a putea* explica *(adică a gîndi)* funcțiile *în termenii* structurilor *ce constituie substratul lor și în a* înțelege *structurile pe baza* organizării lor moleculare.

Odată semnalate limitele practice ale histologiei descriptive clasice, am ajuns la cea de a doua problemă, și anume cea care privește demersul teoretic*.

O carte consacrată chiar și unui domeniu particular al științelor biomedicale fundamentale cum este organizarea celulară și tisulară a corpului omenesc — adică histologia — nu se poate limita la o acumulare de date, de fapte și de concluzii oricît de bine fundamentate ar fi și nici la ierarhizarea acestora după nevoile practice care nu pot fi stabilite decît după criterii arbitrare. O carte din domeniul nostru, pe lîngă fapte certe, trebuie să mai cuprindă și ipoteze; ea trebuie totodată să sugereze limitele cunoașterii actuale. Altfel spus, dintr-o carte trebuie să învățăm fapte dar, totodată, ea trebuie să cuprindă și idei, să fie un instrument de educație științifică experimentală.

Ce este și în ce constă demersul științific experimental? *Privită în perspectiva evoluției umanității, cunoașterea teoretică și în mod special cunoașterea experimentală au apărut foarte recent. În decursul celor circa 200 000 de generații care s-au*

---

* Termenii de *teorie* și *cunoaștere empirică* sînt folosiți în sensul în care au circulat în literatura de specialitate și nu în accepțiunea lor din tratatele de epistemologie.

succedat de la apariția pe Pămînt a lui Homo sapiens și pînă în prezent, gîndirea teoretică (cel puțin în forma pe care o putem recunoaște astăzi), a apărut doar cu cîteva zeci de generații înaintea noastră, adică în mijlocul secolului trecut; cu alte cuvinte, aceasta din urmă s-a cristalizat doar la profesorii profesorilor mei.

La greci, gîndirea era împărțită între cerul teoriei* și pămîntul cunoștințelor bazate pe experiența oamenilor de rînd. Aristotel remarca că rațiunea (sau știința) a început prin cucerirea meseriilor pe care grecii le numeau arte. Politica era considerată și ea un fel de artă a artelor. De aceea Atena era în același timp zeița cetății, înțelepciunea ei însăși și legile ei. Ea era reprezentată înarmată cu o lance, ceea ce înseamnă că, pentru a fi înțelept, adică în concepția vechilor greci, pentru a poseda știința, nu era suficient să învingi soarta rea prin cunoștințe experimentale: trebuia de asemenea să ajungi la o ordine civică și morală. Evenimentele din natură erau astfel mai ușor previzibile decît comerțul și războaiele pe care le făceau oamenii.

Fiind preocupați în cel mai înalt grad de dezvoltarea cunoașterii practice, romanii au împrumutat de la greci multe reprezentări culturale. La romani Minerva era protectoarea Romei dar mai ales zeița artizanilor și a lucrătorilor industriali. Sărbătorile sale erau celebrate de școli și corporații, ea devenind simbolul cunoașterii și înțelepciunii. Dat fiind exodul pe care-l cunosc meseriile în epoca romană, vom avea și o Minerva medica, al cărei templu se afla pe Eschilin. Semnificative pentru raportul între cunoașterea teoretică și cunoașterea practică experimentală în perioada greco-romană sînt elementele lingvistice. În limba greacă veche nois, adică „înțelegerea" sau „rațiunea" trimite la noesis, adică „a cunoaște" sau la gnosis „a ști".

Aceasta înseamnă că la grecii vechi înțelegerea faptelor și cunoașterea faptelor în sine nu sînt decît unul și același lucru. În limba latină însă „a ști" este desemnat prin cuvintele scire sau scientia care se deosebește de „a înțelege" desemnat prin comprehendere sau entendere și care semnifică a cuprinde în ansamblu, a prinde în întregime în plasa înțelesului — concepție care leagă înțelegerea de un fel de captură imperioasă a realului.

Conflictul dintre cunoașterea concretă și teorie, din perioada greco-romană, a constituit terenul favorabil pentru preluarea monopolului celei din urmă de către religie — respectiv de creștinism — și pentru dezincarnarea sa. Astfel timp de peste un mileniu și jumătate dezvoltarea cunoașterii concrete a întîmpinat opoziția îndîrjită a religiei. Abia secolul al XVIII-lea a putut fi caracterizat de Kant prin celebrele cuvinte „Sapere aude!"* .

Din secolul al XIX-lea pînă la mijlocul secolului nostru — în perioada modernă — s-a atribuit științei rolul de a descoperi cauzele și legile fenomenelor. În această perioadă s-au

---

* Cuvîntul „teorie" provine din grecescul „*theòrein*" ceea ce înseamnă „a contempla". Deoarece *thein* înseamnă „a alerga" și *orân* „a vedea", ajungem prin cuvîntul *theòrein* la contemplarea cursei zeilor — adică a aștarilor care au fost primii zei ai caldeenilor și apoi ai grecilor. Ca disciplină contemplativă, gîndirea teoretică a grecilor era separată de știința experimentală simplă a modeștilor practicieni ai științei. De aceea gîndirea filozofică nu era accesibilă oamenilor de rînd ci numai unui cerc foarte restrîns de „spirite alese".

* Îndrăznește să știi!

constituit și s-au consacrat diferitele ramuri ale științelor experimentale și, ceea ce este și mai important, s-a cristalizat metoda sa esențială — observația, ipoteza, verificarea experimentală — formulată de Cl. Bernard. Progresul demersului științific în întreaga această perioadă s-a aflat sub motto-ul „non multa, sed multum".

Metoda experimentală constituie necondiționat și un demers intelectual. Scopul ei este de a reconstitui realul în minte. *Se insistă pe bună dreptate, asupra demersului intelectual, care constă în* a imagina existența unor legături pînă atunci nesesizate între unele din realitățile observate. *Descoperirea acestor legături este actul cel mai prestigios al spiritului științific. Atunci cînd existența acestor legături este sesizată, cunoașterea lor dă omului în același timp, cu o satisfacție intelectuală generatare de memorie și economie de gîndire, puternice mijloace de previziune și de acțiune, de transformare și de domesticire a naturii.*

Această putere a științei a apărut miraculoasă strămoșilor noștri, atunci cînd legăturile cauză—efect, riguroase și precise, pe care ei au început să le identifice, au dus la apariția determinismului.

În cercetarea lumii reale obiectivul esențial al demersului experimental este desigur descrierea, inventarierea, explorarea realului. Fără îndoială aceasta nu este decît prima fază a raționamentului experimental complet, și totodată doar prima jumătate a acestei faze. Cealaltă jumătate este reprezentată de obligația ca ea să fie făcută cu exigență, cu conștiinciozitate, cu competență *și cu respectarea riguroasă a regulilor observației științifice, așa cum sînt stabilite pentru fiecare domeniu al științei în parte.*

Cea de a doua fază esențială, care caracterizează de fapt personalitatea unui observator științific, este voința fermă de a recompune, de a retrăi în minte realitatea în „deplina sa splendoare" în „totalitatea" sa (francezii spun că „splendoarea totală" provine de la Baudelaire iar „totalitatea" de la Péguy). Dar și această fază se află sub semnul unor condiții. Cercetarea științifică nu se constituie prin simpla meditare asupra realului observat; ea constă mai ales în descoperirea realului ascuns, încă neobservat, în general nici bănuit.

Conștiința ignoranței noastre este deci un element major al spiritului științific experimental. *Ceea ce lipsește cel mai adesea atît oamenilor obișnuiți dar și specialiștilor este îndeosebi voința de a se pune la punct cu realitatea ignoranței lor; oamenii se declară cu multă ușurință satisfăcuți de cunoștințe parțiale și aproximative și cred că spiritul științific constă în a acționa în funcție de acestea; în fapt, spiritul științific constă în a ține cont sau, cel puțin, în a lua în considerare și realul necunoscut. Este imperios necesar să ne gîndim mereu la erorile și la aproximațiile care mișună în ceea ce credem că cunoaștem: să confruntăm fără încetare ceea ce credem cu ceea ce este; să rupem în fiecare zi ceva în plus din imensul domeniu al necunoscutului.*

Dar știința are drept obiectiv nu numai să acumuleze informații, să inventarieze realul, să imagineze ipoteze, ci îndeosebi să confrunte reprezentările mentale cu realitatea, să ajungă la explicații cu privire la realitate, deci să le înțelegem.

În accepțiunea pur științifică, dar unilaterală, sensul verbului a înțelege *pare în mod curent bine înțeles. De obicei acesta este echivalent cu „a învăța pe dinafară"; dar, inter-*

Scanned with OKEN Scanner

pretarea comună este prea restrictivă. Se spune, de obicei, că a înțelege un ansamblu de fapte constă în a găsi legăturile dintre ele, legături care fac faptele respective inteligibile; aceasta este adevărat; dar mai trebuie adăugat că a înțelege înseamnă încă și a ancora aceste legături în însuși conținutul gîndirii — trebuie mai ales să legăm lucrurile noi de tezaurul de cunoștințe care s-a acumulat în decursul timpului. Pentru a fi înțeleasă, o idee nouă trebuie să se insere armonios în stocul de idei precedente ca și cînd ea n-ar fi decît un corolar sau un caz special al acestora. Dar uneori, progresul unei idei noi nu se poate impune decît dacă sînt îndepărtate din mințile oamenilor ideile vechi.

De exemplu, mai există printre cei din generația mea, oameni care înțeleg determinismul în mod îngust și simplificator, considerînd că studierea raporturilor cauzale ar reprezenta totul, că s-ar ajunge la o viziune integrală despre fenomenele din natură. Or, raportul dintre cauză și efect fiind necesar și întrucît fiecare realitate este determinată cauzal, rezultă că în univers totul este necesar. Se exclude astfel întîmplarea, ajungîndu-se pe această cale la un determinism strict, univoc, toate realitățile fiind dinainte date și, ca atare, ușor previzibile.

Seducția pe care o exercită încă determinismul clasic asupra unor minți ține de împrejurarea că știința a debutat prin dezvăluirea unor determinări obiective (relații cauzale, legi dinamice): și fără îndoială nu putea debuta altfel. Pentru a înfrînge farmecul viselor, erau necesare probe tangibile, ecuațiile precise, succesele strălucite ale lui Galileo, Torricelli și Newton. Cercetarea legăturii cauză—efect și ușurința cu care le găsim uneori în lumea reală, se află la baza istoriei cunoașterii științifice și ordinii în care s-au născut științele; această orientare a cercetării experimentale explică de ce științele nu s-au născut în ordinea care ar fi fost impusă de satisfacerea necesităților umane, astfel încît astăzi știm să calculăm la sutimi de secundă întîlnirea unei rachete cu planeta Jupiter sau să trimitem pe Lună, un obiect cu precizie de sute de metri, dar nu știm să eradicăm cancerul și nici să prevedem exact, cu certitudine, vremea care va fi mîine.

În adevăr, marea forță a științei constă în capacitatea de a constata relațiile de la cauze la efecte. Astfel, de la descoperirea legilor gravitației, a devenit posibilă prezicerea eclipselor cu mii de ani înainte. La baza acestei uimitoare puteri a gîndirii umane se află o regulă relativ simplă, și anume cea de a doua lege a lui Newton care prevede că forța este egală cu masa înmulțită cu accelerația sa. Această idee excepțională l-a determinat pe Laplace să afirme (în 1776) că pentru a putea determina poziția unui obiect în spațiu pe o perioadă de cîteva sute de ani în urmă sau în viitor, îi este suficient să observe poziția și viteza acestuia într-un anumit moment. Cu toate că în practică s-au ivit numeroase dificultăți pentru a fi atins obiectivul lui Laplace (dată fiind diversitatea și complexitatea obiectelor din spațiu), timp de peste 100 de ani, a părut că în principiu nu există nici un motiv ca el să nu aibă dreptate. Adoptarea concluziei lui Laplace în litera sa, a condus la concepția filosofică după care comportarea umană este complet predeterminată, că nimic nu este întîmplător.

Știința secolului al XX-lea a dus la prăbușirea dogmei lui Laplace din două motive diferite: primul a fost adus la lumină din domeniul mecanicii cuantice. Este vorba de „relația

Scanned with OKEN Scanner

de incertitudine" formulată de Heisenberg, conform căreia poziția și viteza unei particule elementare nu pot fi măsurate cu precizie atunci cînd este precizat impulsul, și reciproc.

Cel de al doilea motiv care a pus în discuție determinismul laplasian își are sursa în domenii de cercetare fără legătură cu mecanica cuantică, adică în perimetrul macrofizicii. Aici unele fenomene ne apar ca previzibile, fapt care demonstrează că ele sînt dependente *unele de altele în mod precis și riguros. Dar există și fenomene imprevizibile. Situația dată conduce spre ideea că în cazul fenomenelor respective se poate vorbi de o anumită* independență. *Reprezentarea deterministă a fenomenelor implică, deci, și acceptarea ideii despre relativa lor independență, căci, de pildă, dacă mișcarea Pămîntului în jurul Soarelui o înțelegem ca fiind dependentă numai de masa sistemului solar și pe de altă parte, dacă căldura degajată de un curent electric într-un fir depinde în mod precis de intensitatea curentului și de rezistența conductorului, de aici nu rezultă că cele două fenomene (relația Soare — Pămînt și căldura din curentul electric)* sînt *dependente unul de altul. De fapt, în cercetare, se procedează adesea considerînd anume procese ca fiind independente. Relațiile dintre fenomenele considerate independente sînt de regulă* relații întîmplătoare *și de aceea imprevizibile.*

Printre exemplele de fenomene „imprevizibile" cel mai frecvent citate sînt vremea *(care rămîne un fenomen probabilistic cu toate că mișcările atmosferice sînt supuse acelorași legi fizice ca și mișcările planetelor),* torenții munților *și* aruncarea zarurilor. *De asemenea,* mișcarea browniană *ca și* mișcările particulelor de praf *dintr-o picătură de apă observată la microscop, constituie exemple clasice de legături în care întîmplarea este nemijlocit prezentă în actul cercetării.*

După cum s-a mai arătat, pînă recent au existat puține motive să ne îndoim că anticipările precise vor putea fi extinse în principiu în toate domeniile, în măsura în care va fi adunată și prelucrată o cantitate suficientă de informații despre fiecare fenomen în parte. Dar un astfel de punct de vedere se află încă o dată contrazis (în afară de cele două motive menționate mai înainte); de această dată de o descoperire foarte recentă, și anume că sisteme deterministice simple *(chiar și cele cu puține elemente)* pot genera comportări întîmplătoare. *Aceasta conduce la concluzia că* legăturile întîmplătoare sînt fundamentale; *nu mai este necesară adunarea de noi informații pentru a putea înțelege caracterul general deterministic al fenomenelor respective ci este suficient să înțelegem mecanismul generării relațiilor întîmplătoare din astfel de fenomene. Legăturile întîmplătoare care apar în astfel de tipuri de fenomene au fost denumite* haos *sau* haotice.

S-a dovedit, că în principiu, și în haos viitorul este determinat de trecut, dar în practică micile incertitudini sînt amplificate exponențial, așa încît cu toate că pe termen scurt comportarea este previzibilă, ea devine imprevizibilă pe termen lung. S-a dezvăluit că există ordine și în haos — la baza comportării haotice, se află de pildă forme geometrice elegante care generează legăturile întîmplătoare în același fel în care un jucător de cărți distribuie un pachet de cărți de joc sau așa cum un cofetar amestecă aluatul.

Teoria haosului reprezintă o nouă paradigmă în modelarea științifică. Pe de o parte, ea implică o nouă

Scanned with OKEN Scanner

limită fundamentală în capacitatea de a face previziri. Pe de altă parte, determinismul inerent haosului implică ideea că numeroase fenomene întîmplătoare sînt mai uşor previzibile decît s-a crezut. Datele adunate şi considerate în trecut ca întîmplătoare — şi desconsiderate ca fiind prea complicate — pot fi acum explicate în termenii unor legi simple. Teoria haosului ne permite să descoperim ordinea în sisteme foarte diverse ca atmosfera, scurgerea robinetelor şi activitatea cardiacă. Aceasta are drept consecinţă o revoluţie în interpretarea unor fenomene din domenii ştiinţifice foarte diferite.

Teoria haosului are implicaţii asupra metodei experimentale însăşi. Metoda clasică de verificare a unei teorii este cea a testării experimentale a previzicrilor teoriei respective. Dacă fenomenele sînt haotice, previzicrile pe termen lung nu mai sînt posibile. De acest fapt trebuie să se ţină cont în evaluarea acelor situaţii speciale. În consecinţă, procesul de verificare a unei teorii se dovedeşte a fi mai complicat.

De asemenea, concepţia actuală despre haos este o nouă respingere a teoriei reducţioniste conform căreia un sistem poate fi înţeles numai *prin împărţirea lui în subunităţi şi prin studierea fiecărei subunităţi în parte. Reducţionismul a prevalat în ştiinţă, în parte, pentru că există numeroase sisteme a căror comportare poate fi în adevăr dedusă prin însumarea proprietăţilor părţilor. Haosul dovedeşte totuşi că sistemele pot avea şi comportări complexe care sînt consecinţa unor cauze simple. Această problemă este deosebit de actuală pentru discipline ca microfizica sau comportarea organismelor vii complexe cum este omul, domenii în care s-au adunat în ultimii ani un număr uimitor de detalii privind organizarea, dar lipsesc concepte generale suficiente pentru interpretarea lor.*

Dar necesitatea şi întîmplarea nu sînt singurele relaţii pe care ni le reprezentăm în cercetare şi pe care le înţelegem. Teoria strategiei jocurilor *descrie în adevăr şi ne face să* înţelegem *ceea ce se cheamă* situaţii condiţionate. *Acestea sînt situaţii pe care ni le reprezentăm, ca putînd să se desfăşoare într-un mare număr de feluri posibile, după legi care nu sînt previzibile nici prin calculul probabilistic şi nici prin calculul algebric obişnuit, dar care nu sînt totuşi nici „oarecare" căci sînt limitate de un număr de condiţii fixe, insuficiente pentru a le determina, dar suficiente pentru a le circumscrie. Se dovedeşte astfel că există un sector considerabil al reprezentării lumii reale, pe care ştiinţa l-a neglijat pînă de curînd, şi care în plan gnoseologic este situat intermediar între „determinat" şi „întîmplător".*

În consecinţă, recunoaştem trei principale tipuri de reprezentare a legăturilor dintre fenomenele lumii reale: (1) relaţii determinate riguros; (2) relaţii întîmplătoare; (3) relaţii condiţionate. Pentru a le exprima în mod inteligibil, adică pentru a le înţelege, folosim în afară de matematica clasică adaptată determinismului, calculul probabilistic care descrie întîmplătorul, calculele strategiei jocurilor ale lui von Neumann şi procesele contraaleatorii ale lui Vendryès care corespund cel puţin unora dintre evenimentele din domeniul condiţionat.

Consideraţiile de mai înainte asupra demersului ştiinţific şi în mod particular asupra raţionamentului ştiinţific experimental, interesează cred, în egală măsură studentul începător şi medicul practician pentru dubla lor poziţie socială, aceea de subiect, *care trebuie să-şi însuşească filosofia ştiinţei odată*

Scanned with OKEN Scanner

cu formația de specialitate și totodată de profesionist *— adică de semănător al științei medicale care implică în egală măsură temeinice cunoștințe științifice de specialitate și un larg orizont socio-cultural bazat pe o teorie, o cultură, o morală și o etică aleasă. De ce o astfel de formație complexă și permanentă a medicului?*

Mai întîi pentru că el își exercită profesia prin contactul nemijlocit atît cu indivizi cît și cu colectivități.

În fiecare săptămînă, în fiecare zi care trece, apar o puzderie de descoperiri științifice. Cele mai valoroase, cele mai fecunde, cele mai uimitoare nu sînt în general cele despre care vorbesc ziarele și celelalte mijloace de comunicare în masă, deoarece acestea nu caută decît informațiile ce pot declanșa emoții și curiozități facile.

Pe de altă parte, gîndirea umană face în fiecare zi un loc din ce în ce mai mare atitudinilor și conceptelor științei experimentale; de asemenea actele noastre zilnice sînt inserate într-un mediu tot mai mult construit după regulile tehnicii experimentale. Această dublă mișcare stimulează pe fiecare om al societății noastre să-și însușească spiritul științific experimental. Dar nu numai atît, dezvoltarea economică și progresul social al unei comunități depind de cunoștințele științifice și tehnice ale cetățenilor săi. O țară subdezvoltată este o țară subinstruită și, invers, o țară subinstruită este o țară subdezvoltată — este vorba de instrucția în mod special în domeniul științelor experimentale.

Astfel, atît pentru a evita înstrăinarea de lumea în care s-au născut, cît și pentru a grăbi progresul social pe care-l doresc, oamenii de astăzi trebuie să-și însușească spiritul științific experimental.

Aceste remarci ne obligă să reflectăm asupra obstacolelor care stau în calea însușirii spiritului experimental.

La ora actuală, absolventul de liceu nu are o instrucție în filosofia științei, care este totuși motorul civilizației contemporane și una din marile speranțe ale umanității. Astăzi, un mare număr de absolvenți și tineri rămîn în școli și universități pînă la o vîrstă ridicată. Este beneficiul unei societăți prospere dar și dificultatea unei societăți tehnice. Se pare că nu trebuie să terminăm niciodată să învățăm ceea ce omenirea știe și ceea ce omul trebuie să știe. Acest fapt dă fiecăruia dintre noi conștiința insuficiențelor personale, dar ne permite să ne imaginăm, dimpotrivă, că știința fiind imensă, poate cuprinde în întregime realul. Dar în fapt, există două domenii ale ignoranței umane — ignoranță individuală și ignoranță colectivă. Medicul are datoria de a lupta cu ambele. Pentru acest motiv cred că activitatea în această direcție trebuie să stea sub îndemnul: multa et multum sapere aude! *Este posibil ca acesta să fie un vis țesut pe parcursul unei cariere îndelungate și într-o perioadă în care știința este uimitor de dinamică. Dar, cîte visuri n-au fost transformate în realități de generațiile următoare?*

Prof. dr. doc. I. DICULESCU

București, ianuarie 1987

Scanned with OKEN Scanner

DIN ISTORICUL HISTOLOGIEI ROMÂNEȘTI

Dacă, așa cum spuneau cronicarii secolului al XVII-lea, ,,rostul istoriei este de a sluji prezentul ca povață și îndemn'', atunci studiul operei marilor înaintași este pe cît de instructiv, pe atît de fascinant. Instructiv, deoarece cu fiecare recitire a predecesorilor, generațiile ajunse la maturitate au totdeauna prilejul să constate că timpul adaugă mereu noi dimensiuni și noi valențe marilor valori științifice. Fascinant, pentru că generațiile care vin, pot găsi în viața marilor noștri înaintași, exemple stimulatoare de muncă și de luptă pentru progres social. Istoria mai mult decît seculară a histologiei românești este o măreață pagină a fecundității și vitalității spirituale a poporului nostru.

PRIMA CATEDRĂ DE HISTOLOGIE DIN ȚARA NOASTRĂ

Prin ordinul nr. 14 183/16 noiembrie 1879, doctorul Nicolae Kretzulescu, ministrul Cultelor și Instrucțiunii Publice, aducea la cunoștință profesorului Gh. Polizu, decanul Facultății de Medicină din București: ,,Prin Înaltul Decret Domnesc nr. 2 829 din 15 curent, se aprobă ..... opiniunea emisă de către consiliul acelei facultăți * întru separațiunea cursului de hystologia de la catedra de anatomia, căruia adaugîndu-se și tehnica microscopică să facă obiectul unui curs separat .....''. ,,Ministerul audiind și consiliul permanent de instrucțiune, a însărcinat pînă la rezultatul concursului ce are a se publica, cu suplinirea ..... pe Dl. Dr. Petrini de Galatz pentru histologia și tehnica microscopică, rămînînd Dv. numai cu anatomia descriptivă''.

Înființarea catedrei de Histologie și Tehnică Microscopică la Facultatea de Medicină din București, cu peste 100 de ani în urmă, reprezintă în fapt actul de naștere al învățămîntului histologic în țara noastră (următoarele catedre de histologie vor apărea peste zece ani, la Facultatea de Medicină din Iași și la Facultatea de Medicină Veterinară din București) și se înscrie ca o probă elocventă a unei gîndiri științifice medicale înaintate a acelor vremuri și a spiritului de răspundere socială.

În 1879 doctrina celulară a lui Schleiden și Schwann, aflată în al 40-lea an de la apariție, se verificase pe deplin și își dovedise fecunditatea, iar teh-

* Facultatea de Medicină

Scanned with OKEN Scanner

nica microscopică cunoscuse o largă dezvoltare. Pe baza acelei generalizări teoretice de importanță unică — a teoriei celulare — , precum și a progreselor făcute de tehnica microscopică, în a doua jumătate a secolului al XIX-lea, histologia era una din științele biomedicale de avangardă. Mai mult, prin impulsul dat cercetărilor de microscopie aplicată ca și prin generalizările teoretice ale lui Virchow, histopatologia devenise un domeniu științific plin de dinamism. Așadar, organizarea învățământului histologic asigura progresul școlii noastre medicale în cunoașterea biologică fundamentală și, în același timp, o deschidere eficientă către patologie. Sensul profund al înființării catedrei de Histologie este foarte clar exprimat în ordinul emis de doctorul N. Kretzulescu, care a aprobat propunerea consiliului profesoral prin care se cerea înființarea catedrei de histologie. În ordinul menționat se evoca nevoia „de a vedea facultatea noastră de medicină dînd doctori români cu studii complete, fără a mai avea neapărată trebuință de a merge la facultăți streine".

Facultatea de medicină din București, dispunînd, la vremea respectivă, de o catedră de histologie, s-a situat printre primele instituții similare de învățămînt superior din Europa. La Facultatea de Medicină din Paris, G. Robin devine, în 1862, primul profesor de histologie. În anul 1875, celebrul Ranvier începe să predea histologia la Collège de France, ca șef al unei catedre distincte. Aici se formează dr. M. Petrini-Galatz, primul titular al catedrei. Între histologii de seamă care au lucrat sub îndrumarea lui Ranvier la Collège de France, se află și Landowsky, primul profesor de histologie de la Petersburg.

Dar actul înființării catedrei de histologie și tehnică microscopică, plin de implicații în viața medicală a țării, apare în adevărata lui semnificație socială dacă este privit în contextul evenimentelor politice ale istoriei noastre din acea vreme, care material, și în egală măsură spiritual, îi conferă o valoare deosebită. Anul 1879 era primul an de pace după realizarea marelui ideal al românilor, obținut cu eroice sacrificii — independența statului român. Entuziasmul și mîndria, firești unui popor care își vedea împlinite visuri seculare, s-au reflectat din plin în concepțiile, faptele și eforturile, intelectualității, ale personalităților ei celor mai reprezentative. Meritele cucerite se cereau dezvoltate și extinse prin noi realizări, între care cele științifice puteau ocupa un loc de seamă, puteau aduce un bun renume și un larg cîmp de afirmare a talentelor și potențialităților românești. Pe această linie, înființarea catedrei de histologie făcea parte dintr-un șir de acțiuni în fruntea cărora se afla constituirea, în martie al aceluiași an, a Academiei Române.

Dar în acea vreme, a conferi forță științei românești era nu numai un imperativ național, ci totodată și o vocație internațională. Și de aceasta erau conștienți intelectualii români înaintați, căci în ordinul mai sus-citat al Ministerului Instrucțiunii, măsurile de îmbunătățire a organizării facultății de medicină erau asociate cu conștiința că „reputația ei să fie bine stabilită nu numai în țara noastră, dar chiar în statele vecine de unde tinerimea ar putea veni să studieze". De la înființare (1854), școala de medicină din București a format medici români pentru *toate* teritoriile locuite de români — Țara Românească, Moldova, Transilvania și Macedonia. De asemenea, la această școală s-au format numeroși medici veniți mai întîi din statele vecine și apoi din toate colțurile lumii.

Scanned with OKEN Scanner

Înființarea catedrei de histologie în secolul trecut este legată de numele a două personalități proeminente ale începuturilor învățămîntului medical românesc, *N. Kretzulescu* și *G. Polizu*. Ei au adus importante contribuții la organizarea și afirmarea histologiei în România.

N. Kretzulescu (1812—1900) și-a susținut teza de doctorat în medicină la Paris, în 21 iunie 1839, avînd ca subiect „Asupra structurii tisulare a dinților văzuți la microscop. Asupra caracteristicilor microscopice a diferitelor umori ale ochiului, în special asupra structurii cristalinului". Doctorul Nicolae Kretzulescu este primul român care a efectuat și publicat cercetări de histologie tipărite într-o limbă de circulație mondială, în chiar anul în care Th. Schwann își publica celebra sa lucrare reprezentînd generalizarea teoriei celulare la întreaga lume vie. Excepționala sa formație în domeniul științelor biomedicale fundamentale la una din cele mai strălucite facultăți de medicină ale timpului, vocația sa de patriot de statură națională care a dominat politica culturală românească o mare parte a veacului trecut, s-au repercutat în mod benefic și asupra începuturilor școlii medicale românești. Dr. N. Kretzulescu este în fapt ctitorul școlii noastre medicale și totodată cel care i-a influențat de la începuturi conținutul, militînd în permanență pentru emanciparea ei. Pe această linie trebuie remarcat mai întîi, că în cursul său de „Anatomia și fizologia trunchiului omenesc", predat la Școala de mică chirurgie deschisă la Colțea în ianuarie 1842, el a dat o largă extensiune „*anatomiei microscopice generale și histologiei*". Întrucît această orientare i-a fost reproșată de Eforia Spitalelor, el a motivat că numai astfel „acei dintre studenții ce vor avea știință și rîvnă, și vor voi să împingă studiul medicinii pînă la sfîrșit, vor avea mare înlesnire să o facă, ducîndu-se la vreo academie din Europa". Pentru acest motiv școala sa a fost frecventată nu numai de bărbieri și felceri ci și de elevii claselor superioare de la gimnaziul „Sf. Sava".

N. Kretzulescu (1812—1900)

Histologia este oficial introdusă pentru prima dată, ca un curs de sine stătător în *Curriculum*-ul Școlii de medicină din București, încă din semestrul de iarnă 1859/1860 (adică la numai 5 ani de la înființarea școlii lui Davilla), sub titlul „Anatomia microscopică generală și histologia" și aceasta, desigur, sub influența lui N. Kretzulescu.

Ludovic Fialla (1831—1918) a fost primul profesor de histologie la Școala de medicină din București. Acestuia i s-a încredințat cursul de Anatomie Microscopică și Histologie, pe care l-a predat între anii 1859 și 1867. Ulterior el a ținut, paralel cu histologia, și cursuri de oftalmologie la Spitalul Colțea, precum și de practică chirurgicală la Filantropia.

Scanned with OKEN Scanner

La începutul acestui secol, termenii de „anatomie microscopică generală" și „histologie" erau curent folosiți în toate țările avansate reflectînd influența unuia dintre fondatorii histologiei ca știință — X. Bichat —, care-și publicase faimoasa sa carte „Anatomia generală microscopică aplicată la fiziologie și la medicină" *(Anatomie générale microscopique appliquée à la Physiologie et à la Médecine)*.

De notat că anatomia microscopică generală și histologia a fost o disciplină distinctă în *Curriculum*-ul școlii noastre medicale pe întreaga perioadă 1859—1879. În toată această perioadă Histologia (și Anatomia Microscopică Generală) a fost un curs de sine stătător, deci o disciplină separată, predată de profesori anume desemnați, figurînd ca atare în programele anuale ale facultății și constituind obiectul unor examene separate și obligatorii. Astfel, catedra alcătuită din anatomie descriptivă, anatomia microscopică generală și histologia precum și fiziologia, este menționată între catedrele Facultății de Medicină înființată prin „Legea educației" și aprobată prin decretul nr. 1 150/24 nov. 1864, art. 254. Mai mult, histologia este menționată printre examenele strict necesare în vederea obținerii diplomei de „doctor în medicină" de către consiliul facultății din 3 ianuarie 1865, care precizează că „prima examinare ce trebuie efectuată să fie de *anatomie, histologie, fiziologie* și *disecție*".

Începînd din anul școlar *1867/1868* cursul de anatomie microscopică generală și histologie la Școala de medicină din București, a fost ținut de prof. G. Polizu (1818—1886) care devine astfel cel de al doilea profesor de histologie. El ținea cursul de histologie în semestrul de vară, cu două clase. După transformarea școlii în facultate de medicină (2 nov. 1869), el a fost numit șeful catedrei de anatomie, histologie și fiziologie, iar Emanuel Severin, șeful catedrei de anatomie și histologie patologică. Primul *curriculum* al Facultății de Medicină, din anul universitar 1869/1870, elaborat de prof. Polizu, devenit decan al facultății, a stabilit ținerea cursurilor de histologie atît în semestrul de iarnă cît și în semestrul de vară. Prof. Polizu a ținut cursul de histologie pînă în anul 1871/1872.

Începînd din anul 1872/73, noul profesor de histologie devine *dr. M. Obedenaru* (1839—1885), care este cel de al treilea profesor titular al acestei discipline. El și-a ținut cursurile de histologie cu studenții anului II, marțea, joia și sîmbăta de la 4 la 5 p.m., în clădirile Universității din București. În decursul anilor 1872—1879, histologia a dobîndit un mai mare grad de independență, deoarece organizatoric continua să facă parte din catedra de anatomie și histologie, dar era predată de M. Obedenaru care devenise titularul catedrei de fiziologie și patologie infantilă. Pentru acest motiv în perioada amintită Histologia figura în programa Facultății de Medicină în fruntea listei „cursurilor complementare obligatorii" de pe lîngă „catedrele fundamentale" (vezi programa din 2 decembrie 1874).

Histologia a devenit catedră de sine stătătoare începînd cu anul *1879/1880*. Profesorul G. Polizu a avut satisfacția, în ultimul an în care a funcționat ca decan, să pună în practică decretul de înființare a noului departament de histologie, disciplină pe care a predat-o și a condus-o atît de mulți ani.

Scanned with OKEN Scanner

Primul profesor titular al catedrei de *histologie şi tehnică microscopică* de la *Facultatea de Medicină din Bucureşti*, a fost *dr. Mihail Petrini-Galatz*, şeful departamentului între 1879 şi 1893; au urmat *dr. Alexandru Obreja*, între 1893 şi 1913, şi *dr. Ion Bruckner*, între 1913—1918.

La *Facultatea de Medicină Veterinară din Bucureşti*, începînd din anul 1889/1890, se înfiinţează un curs de histologie şi embriologie, predat mai întîi de prof. *Gavrilescu* şi încredinţat apoi profesorului *Ion Athanasiu*, care l-a predat paralel cu cel de fiziologie animală, pînă în anul 1904; din anul 1904 şi pînă în anul 1923 cursul de histologie la această facultate este predat de prof. *Ion Drăgoi*. La *Facultatea de Ştiinţe din Bucureşti*, începînd din anul 1894 se înfiinţează catedra de zoologie şi morfopatologie animală al cărui titular devine prof. *Dimitrie Voinov*, care conduce catedra (devenită între timp catedră de anatomie şi histologie animală) pînă în anul 1937. La *Facultatea de Medicină din Iaşi*, catedra de histologie se înfiinţează în anul 1890, primul ei titular fiind prof. *Emil Puşcariu*, care a condus catedra pînă în 1928.

Aceştia trebuie consideraţi *fondatorii învăţămîntului histologic românesc*, deoarece ei au organizat instrucţia universitară de specialitate în facultăţile de profil şi pentru că au promovat cercetări de neurohistologie, citologie şi citofiziologie, care au făcut cunoscute peste hotare şcolile de histologie şi citologie din România. Pe lîngă şcolile fondate de aceşti savanţi, s-au format cadre care au reprezentat în mod strălucit ştiinţa românească în perioda interbelică şi cea actuală.

Prof. *M. Petrini-Galatz* a publicat în 1891 primul curs de histologie în România; a organizat cursuri şi lucrări practice de histologie. În departamentul său, şi-au început cariera universitară ca preparatori, cunoscutul neurolog şi savant de renume mondial prof. *Gh. Marinescu*, renumitul şef al şcolii de anatomie românească prof. *Fr. Rainer*, precum şi prof. *Nicolae Tomescu*. Elev al lui Ranvier, Petrini-Galatz este întemeietorul şcolii de neurohistologie din Bucureşti.

Prof. *Alexandru Obreja* a organizat laboratorul de histologie în clădirea în care funcţionează şi astăzi. Şi-a publicat cursurile sale de histologie, a promovat investigaţii de neurohistologie şi a format o pleiadă de viitori şi foarte cunoscuţi histologi ca: dr. Vranialici, dr. Tatuşescu, dr. Şt. Besnea şi dr. P. Gălăşescu. Acesta din urmă a devenit primul profesor de histologie la Facultatea de Medicină din Cluj şi apoi eminent profesor de anatomie patologică la Iaşi.

Prof. *Ion Bruckner* a murit eroic în campania de combatere a tifosului exantematic în timpul primului război mondial. În numai cinci ani, ca şef al departamentului, a format histologi cunoscuţi, dintre care I. Enescu şi Al. Ţupa, amîndoi titularizaţi profesori la Facultatea de Medicină din Iaşi, ultimul fiind considerat ca fondatorul şcolii de histologie a acestei facultăţi (Mârza şi colab. — *Rev. Medico-Chirurgicală*, Iaşi, 1956, 1, 5).

Profesorii *Ion Athanasiu* şi *Ion Drăgoi* îşi consacră activitatea, la începutul acestui secol, la Facultatea de Medicină Veterinară din Bucureşti, *histofiziologiei ţesutului muscular*. În această direcţie ei fac descoperiri originale privitor la distribuţia fibrelor conjunctivo-elastice în diferitele tipuri de ţesuturi musculare şi descriu alcătuirea membranei bazale sarcolemale,

Scanned with OKEN Scanner

ca și relațiile acesteia cu elementele conjunctivo-elastice. Totodată ei sînt precursorii descoperirii *tubilor transversali* ai reticulului sarcotubular (vezi *C.R.Ac.Sci., Paris*, 1910, *151*, 553 și *C.R.Soc.Biol.*, 1924, *97*, 730). După numirea prof. I. Drăgoi la Facultatea de Medicină din Cluj, disciplina de histologie este condusă de prof. Gh. Nichita (1923—1928), apoi de prof. I. T. Niculescu (1928—1932) și, în continuare, de prof. I. Bădescu (1932—1948) — ultimii doi, elevi distinși ai școlii lui Șt. Besnea.

Profesorul *Dimitrie Voinov* este ctitorul școlii de histologie și citologie de la Facultatea de Științe din București. La începutul îndelungatei sale cariere universitare el tipărește cartea „Principii de microscopie" (București, 1900) care a avut meritul de a promova tehnica histologică și metodele citofiziologice în laboratoarele din țara noastră. Școala fondată de el va dobîndi strălucire în perioada interbelică.

MAEȘTRII

La *Facultatea de Medicină din București*, în perioada 1918—1960, trei personalități ale medicinii românești, remarcabile ca valoare profesională și științifică, unanim recunoscuți în țară și peste hotare, s-au succedat la catedra de histologie: prof. *Șt. Besnea* (1918—1936), prof. *I. T. Niculescu* (1936—1957) și prof. *A. Hagi-Paraschiv* (1957—1960).

Mai bine de 40 de ani ei au cooperat admirabil ca maeștri ai histologiei românești, aducînd o contribuție excepțională la prestigiul școlii medicale din București.

În mediul creat de ei și-au început cariera științifică un mare număr de medici care au reprezentat ulterior în mod strălucit diferite domenii medicale românești: I. Pavel, G. Litarczek, M. Popper, care s-au afirmat în domeniul medicinii interne; I. Bădescu, Gh. Alexandrescu, Gh. Tacu, I. Bazgan, D. Răileanu, S. Brătianu, C. Râmniceanu, V. Angelescu, în domeniul histologiei normale și patologice; D. Bagdasar și C. Arseni, eminenți neurochirurgi; Sager și Horneț în neurologie etc. Prof. S. Brătianu a fost inițiatorul învățămîntului histologiei la Facultatea de Medicină din Timișoara și a ilustrat apoi pe cel de anatomie patologică la Iași. Prof. Constanța Râmniceanu a condus catedra de histologie din Timișoara peste 20 de ani, iar prof. I. Bădescu a ilustrat vreme îndelungată catedra de histologie și embriologie a Facultății de Medicină Veterinară din București.

Toți cei care au condus catedra de histologie de la Facultatea de Medicină din București au fost preocupați de ridicarea continuă a învățămîntului histologic în raport cu cerințele timpului; ei au promovat un climat favorabil de emulație, în care generațiile contemporane să se poată forma iar învățămîntul histologic din țara noastră să dobîndească reputație internațională.

Dintre toți aceștia, prof. *Ion T. Niculescu* (1895—1957) a fost unul dintre cei mai de seamă histologi români, cu o strălucită reputație științifică, a cărui influență persistă în literatura de specialitate și în prezent; aceasta grație descoperirilor lui în neurohistologie, domeniu în care a lucrat în țară pe lîngă prof. Gh. Marinescu, prof. Șt. Nicolau, dr. Gh. Noica, iar la Paris — pe lîngă marele neurolog și histopatolog Charles Foix. El a devenit colaboratorul apropiat al lui Charles Foix la mai multe din lucrările pe care le-au publicat în revistele de specialitate din întreaga lume și în special în

Scanned with OKEN Scanner

tratatul intitulat „Nucleii cenușii centrali și ai regiunii mezencefalo-supra-optice", distins cu premiul Saintour (1926) al Academiei de Medicină din Paris. Convins de necesitatea cercetării pentru o mai profundă înțelegere a histo-fiziologiei diferitelor grupe neuronale și a conexiunilor lor, în scopul de a oferi neurologului o privire mai clară a leziunilor acestor regiuni, I. T. Niculescu a îmbogățit cunoștințele noastre privind organizarea formațiunilor extrapiramidale de la baza creierului, sistemul funcțional al nucleilor olivari, sistemul sensibilității proprioceptive, mielogeneza în sistemul piramidal, terminațiile nervoase viscerale. Rezultatele sale sînt publicate în monografia „Morfologia patologică a sistemului nervos", apărută la Edit. Medicală în 1957 și Atlasul cu text în cinci limbi, editat la Edit. Academiei, în care înmănunchează rezultatele îndelungatei sale experiențe științifice.

Prof. Ion T. Niculescu (1895—1957).

Crescut în spiritul muncii intense și al probității, nu s-a abătut niciodată de la disciplina în muncă; mai sever cu el însuși decît cu alții, le-a inspirat studenților săi pasiunea pentru știință, corectitudinea în viața și profesiunea lor și cultul muncii, așa cum spune în prefața ultimei sale monografii: „munca personală lungă, laborioasă ... făurește acea emulație admirabilă care face măreția ambianței oricărei intelectualități pure". Viața și întreaga activitate a prof. I. T. Niculescu este un exemplu de pasiune, perseverență și abnegație dedicată generațiilor de medici, științei și prestigiului țării noastre.

La *Facultatea de Medicină din Iași* s-a înființat cea de a doua catedră de histologie din învățămîntul nostru medical. Primul titular al acestei catedre a fost *prof. Em. Pușcariu* pînă în 1928; lui i-au succedat prof. *Gr. T. Popa* (1928—1932), prof. *Al. Țupa* (1932—1957), *acad. V. Mârza* (1957—1972), prof. *Gh. Hurduc* (1972—1978) și prof. *Gioconda Dobrescu* (din 1980 și în prezent).

Această catedră oferă un exemplu strălucit de continuitate și productivitate științifică.

Profesorul *Gr. T. Popa*. Cu toate că cea mai mare parte a carierei sale didactice a fost consacrată anatomiei, prin formația sa, și îndeosebi prin producția sa științifică, rămîne o mîndrie și un reper al histologiei românești. Ca elev al profesorului Fr. Rainer (care își începuse cariera ca preparator de histologie la Petrini-Galatz), a adus o mare contribuție la orientarea morfofuncțională a histologiei românești. Cercetările în domeniul spermatozoidului și îndeosebi cele asupra histologiei sistemului port hipofizar, reprezintă repere ale științelor biomedicale românești și puncte culminante ale producției noastre spirituale, care l-au făcut celebru în științele biomedicale fundamentale.

Scanned with OKEN Scanner

Prof. *Al. Ţupa*, fost elev al prof. I. Bruckner, este considerat ca meşterul făurar al şcolii histologice ieşene, pe care a condus-o cu înaltă competenţă şi cu multă rigoare ştiinţifică, timp de peste un sfert de veac.

Acad. *V. Mârza*, decanul de vîrstă al histologilor români contemporani, este reprezentantul ilustru al şcolii din Iaşi. El simbolizează în egală măsură vitalitatea şcolii ieşene şi esenţa ei spirituală. În îndelungata sa carieră didactică în domeniul histologiei, a fost elevul lui Em. Puşcariu, al lui Gr. T. Popa şi al lui Al. Ţupa. Şi-a desăvîrşit pregătirea în histofiziologie pe lîngă celebrul histolog francez A. Pollicard dar şi în anatomia patologică la Institutul de Cancer de la Villejuif şi la Facultatea de Medicină din Paris. El s-a făcut cunoscut în literatura de specialitate încă de tînăr, în perioada interbelică; prin cercetările de histochimie a spermatozoidului şi a potasiului celular; s-a remarcat ulterior prin cercetări asupra vitelogenezei, a ovogenezei şi a microscopiei cantitative; şi-a consacrat o mare parte din studiile sale, teoriei stereotipurilor biologice, dezvăluirii legităţilor interne ale organizării biologice precum şi ierarhizării subsistemelor organismului considerate ca întreg.

ŞCOALA DE CITOLOGIE DE LA FACULTATEA DE ŞTIINŢE DIN BUCUREŞTI

Profesorul *Dimitrie Voinov* a fondat la sfîrşitul secolului trecut una dintre cele mai renumite şcoli de citologie care a strălucit în prima jumătate a secolului nostru. Din primii ani ai carierei sale, Voinov s-a dedicat studiilor de microscopie. Încă de la începutul secolului nostru el a publicat cercetări valoroase asupra gametogenezei şi a fost cel care a descoperit aneuploidia la animale. S-a devotat apoi cercetărilor asupra organitelor citoplasmice, descriind mecanismul diviziunii mitocondriilor pe care a denumit-o *condrodiereză*. Opera sa capitală a fost însă elaborată în perioada imediat următoare primului război mondial şi a fost consacrată *naturii aparatului reticular intern al lui Golgi*. Graţie cercetărilor sale riguroase şi sistematice, prof. Dimitrie Voinov, împreună cu o pleiadă de colaboratori, au reuşit să demonstreze (în perioada 1924—1934) că complexul Golgi este un aparat celular distinct şi ubicuitar, prezent atît la vertebrate cît şi la nevertebrate şi că el se prezintă la microscop mai ales ca nişte „corpusculi sub formă de solzi", pentru care a adoptat denumirea de *dictiozomi*. El a fost printre cei care au atribuit dictiozomilor golgieni şi o proprietate secretorie, dovedind că segmentul cromofob al dictiozomilor (pe care l-a denumit ergastoblast) elaborează diferite produse secretorii ca mucus, granule de zimogen, vitelus şi formează acrozomul spermatozoizilor. Aceste cercetări au constituit

Prof. Dimitrie Voinov

temelia școlii de citologie formată de prof. Dimitrie Voinov, ai cărui elevi și colaboratori au devenit ei înșiși personalități proeminente ale citologiei și histologiei românești. Așa au fost profesorii *Gh. T. Dornescu, I. Steopoe, M. Ionescu-Varo* și Mișcalencu sau prof. Margareta Dumitrescu și Th. Bușniță de la Facultatea de Biologie din București sau prof. *V. Gh. Radu* de la Facultatea de Științe din Cluj și mulți alții.

Semnificativ pentru reputația științifică a lui Voinov este faptul că în „Tratatul de biologie generală" editat de P. P. Grassé (Masson et Cie, Paris, 1966), capitolul referitor la aparatul Golgi începe cu confruntarea a două figuri de microscopie — una după Voinov, asupra dictiozomilor răspîndiți în citoplasmă și cealaltă, după Golgi, care reprezintă ceea ce era cunoscut la începutul secolului ca aparatul reticular intern.

La *Facultatea de Medicină din Cluj*, în anii imediat următori desăvîrșirii unității noastre naționale, catedra de histologie l-a avut ca titular pe prof. *Ion Drăgoi* (1923—1941), căruia i-au succedat elevii săi prof. *C. Crișan* (1941—1957) și prof. *Mihalca* (1957—1966) iar apoi conf. *V. V. Papilian* (1966—1982) și conf. Cristea.

Prof. *Ion Drăgoi* (1878—1941) a fost una dintre cele mai strălucite personalități ale histologiei și citologiei românești. A fost elevul celebrului fiziolog român Ion Athanasiu și continuatorul eminent al școlii de citofiziologie și histofiziologie fondată de acesta la București. La începutul secolului, deci încă de tînăr, Ion Drăgoi s-a făcut cunoscut, în literatura de specialitate, prin cercetările întreprinse împreună cu maestrul său asupra țesuturilor musculare. În perioada 1919—1923 lucrează la Collège de France, unde colaborează cu histologi celebri ca Fauré-Fremiet.

Prof. Ion Drăgoi (1878 — 1941)

Cercetările efectuate de I. Drăgoi la Paris (publicate în teza sa de doctorat sau în colaborare cu Fauré-Fremiet) și dezvoltate apoi la Cluj, în cursul anilor 1920 și 1930 (publicate singur sau în colaborare cu prof. I. Nițescu), au avut ca temă principală *citologia, embriologia și histofiziologia plămînului*. În acest domeniu contribuțiile sale rămîn și în prezent puncte de referință în literatura de specialitate. De exemplu, lucrarea consacrată dezvoltării embrionare a plămînului de oaie, publicată în colaborare cu Fauré-Fremiet în *Arch. Anat. Microscop.*, 1923, *19*, 411—479, este o lucrare fundamentală în acest domeniu. În cadrul acestor cercetări este formulată „legea generală a dezvoltării pulmonului foetal"* pe baza determinării, în funcție de etapele dezvoltării, a valorii azotului total, apei, acizilor grași ficși, colesterolului, fosforului lipidic și glicogenului.

* Se referă la evoluția în ontogeneză a compoziției chimice a plămînului.

I. Drăgoi și Fauré-Fremiet trebuie considerați precursorii concepției moderne despre pneumocitul granular. Pe baza cercetărilor *histochimice* se dovedește că ,,celula granulară pulmonară" (cum o denumesc ei) este prezentă în plămînul embrionului de oaie încă de la începutul celei de a II-a jumătăți a gestației și că ea se caracterizează ,,par la présence de nombreuses inclusions lipoïdiques indépendantes du chondriome et la présence au niveau de celles-ci d'un composé sulfuré réductible par le formol et pouvant donner des sulfures métalliques" (idem p. 470). De asemenea, pe baza unei analize minuțioase a datelor morfometrice și biochimice, se constată că legea generală a dezvoltării plămînului se aplică și în cazul evoluției țesuturilor pulmonare, și în mod special a țesutului epitelial. Astfel se consideră că apariția celulei granulare în decursul ontogenezei reflectă tocmai valabilitatea acestei legi: ...,,la composition de cet élément (este vorba de țesutul epitelial) s'écarte progressivement de celle qui caractérise sont état primitif, jusqu'au moment où il subit une transformation rapide qui modifie entièrement son aspect morphologique et créé un type cellulaire nouveau" (idem, p. 469). Se concluzionează că celula epitelială granulară ,,n'est plus une cellule du type primitif, ou embryonnaire, et qu'elle est devenue morphologiquement et chimiquement un élément spécial" (idem, p. 471).

Un alt grup de cercetări, consacrate *citofiziologiei*, au fost efectuate la Cluj în colaborare cu F. Vlés, Gr. Benetato, Opreanu sau C. Crișan. Dintre acestea s-au impus cercetările privitoare la *efectul presiunii osmotice asupra diviziunilor celulare*, precum și cele asupra *activității respiratorii a ovocitelor de mamifere*.

Prof. I. Drăgoi este autorul ,,Tratatului de histologie" (tipărit în mai multe ediții, după moartea sa, de către elevul său, C. Crișan), tratat care a stat la baza pregătirii tuturor generațiilor de medici din țara noastră în perioada 1929—1956.

CONTEMPORANII

Din anul universitar 1944/1945, învățămîntul nostru medical a pătruns într-o etapă importantă a dezvoltării sale prin organizarea a două noi facultăți de medicină (pe lîngă cele trei ce fiinţaseră anterior) — cea de la Timișoara și cea de la Tg. Mureș. Privit din perspectiva celor peste 40 de ani care s-au scurs, acest moment apare ca un eveniment deosebit atît pentru medicina noastră cît și pentru știința și cultura românească. Și aceasta pentru că cele două facultăți au devenit astăzi două instituții de știință și cultură românească cu rădăcini puternice în zonele respective și totodată cu un prestigiu care a depășit cu mult granițele țării. Evocînd importanța actului întemeierii Facultăților de Medicină de la Timișoara și de la Tg. Mureș, trebuie să aducem un omagiu acelor oameni minunați care și-au asumat greaua dar nobila sarcină de a organiza noi cetăți de cultură și știință românească. Așa cum era și firesc, organizarea și dezvoltarea în primii ani a învățămîntului medical în noile centre de la Timișoara și de la Tg. Mureș, s-a făcut în strînsă corelație cu facultățile de la București și, respectiv de la Cluj, care se bucurau în perioada respectivă de o reputație bine stabilită.

Împrejurările au făcut ca *Facultatea de Medicină de la Timișoara* să fie organizată și condusă (ca decan) de profesorul *Șerban Brătianu*, un reprezentant distins al școlii histologice din București. În perioada interbelică,

dr. Șerban Brătianu făcuse cercetări strălucite în domeniul sistemului reticulo-endotelial, atît în țară cît și în Franța. El devenise o autoritate unanim recunoscută în histologia și patologia sistemului limfoid și a sîngelui. De asemenea el a tipărit o foarte valoroasă carte de histologie generală. Dr. Șerban Brătianu a fost primul decan al Facultății de Medicină din Timișoara și primul titular al catedrei de histologie, pe care a condus-o pînă în anul 1953, cînd s-a transferat ca șef al catedrei de anatomie patologică de la Iași. Avînd o remarcabilă cultură biomedicală, care impunea admirația elevilor săi și stima interlocutorilor, el a fost unul din cei mai valoroși reprezentanți ai științelor morfopatologiei românești din perioada postbelică.

Profesorului Ș. Brătianu i-a succedat prof. dr. *Constanța Râmniceanu* care a condus cu strălucire această catedră timp de 20 de ani. Ea provenea de la școala din București, făcuse studii alese la Paris și a dus la înflorirea și consacrarea deplină a școlii histologice din Timișoara. Prof. C-ța Râmniceanu a fost o prezență activă în știința românească pînă în ultimii ani. Participarea ei la manifestările științifice din domeniul științelor morfologice din țară și străinătate a adus întotdeauna distincție și strălucire.

În ambianța de distincție și probitate științifică creată la Timișoara de profesorii Ș. Brătianu și C. Râmniceanu, catedra de Histologie a fost condusă succesiv, în continuare, de prof. *Cristalo Miclea* și prof. *M. Drăgan*. Aceștia au continuat și au cinstit opera făurită de predecesorii lor.

Catedra de histologie de la Facultatea de Medicină din Tg. Mureș a fost organizată și condusă timp de peste 25 de ani de prof. *Mihai Gündis*, care se formase ca o distinsă personalitate a histologiei noastre la școala histologică din Cluj-Napoca. După pensionarea prof. Gündis, catedra de Histologie de la Tg. Mureș este condusă de prof. *Gh. Roșca*, un alt elev al școlii din Cluj-Napoca; el s-a făcut cunoscut prin cercetări în domeniul sistemului endocrin difuz.

Cu 20 de ani în urmă s-a înființat cea de a 6-a *Facultate de Medicină, la Craiova*. Disciplina de histologie de la această facultate este condusă de conf *dr. Fl. Bogdan*, care s-a format la școala de histologie din Iași, sub conducerea acad. V. Mârza.

În această perioadă, catedra de histologie de la Iași a fost ilustrată de prof. Al. Țupa, acad. V. Mârza și elevii lor, iar la Cluj, de prof. C. Crișan și ceilalți elevi ai lui Drăgoi.

Catedra de Histologie și citologie de la Facultatea de Medicină din București, în prima parte a perioadei contemporane a fost condusă cu strălucire de prof. I. T. Niculescu (decedat în plină forță creatoare, în 1957) și de prof. A. Hagi-Paraschiv (1957—1960). Din 1960 linia urmată ar putea fi sintetizată în expresiile *continuitate* și *actualitate*.

Urmărind excelenta *tradiție* a catedrei, ori de cîte ori a fost posibil, au fost abordate teme de *neurohistologie*. Dată fiind explozia tehnologică pe care o cunoaște domeniul nostru de activitate (ca urmare a aplicațiilor rapide ale cuceririlor tehnico-științifice contemporane), a devenit imperios necesară deschiderea unei noi direcții de cercetare pe baza asimilării, introducerii și dezvoltării unor *metode moderne* de investigare a lumii vii la nivelul de organizare celular și tisular. Efortul de modernizare s-a concretizat sub raport tematic în dezvoltarea unor cercetări de *biologie celulară sau tisulară* (ca bazele celulare ale unor procese metabolice sau bazele celulare ale cuplării excitație-contracție, transmiterii impulsului nervos și secreției celulare). Sub raport

ehnologic, efectul de modernizare a condus la dezvoltarea unor cercetări de *histoenzimologie* și de *citochimie ultrastructurală*.

Prima consecință a acestei orientări a fost elaborarea și publicarea unor cercetări prin care s-au obținut priorități științifice, al căror caracter original este atestat de cercurile științifice de specialitate. Cercetările catedrei din ultimii 25 de ani au fost publicate în unele din cele mai prestigioase reviste de specialitate. Dacă se ia în considerație dinamica citărilor pe ultimii 15—20 de ani, așa cum se reflectă ea în *Science Citation Index* și în *Index to Scientific Review*, prioritățile științifice ale catedrei au un ecou tot mai larg și deosebit de pozitiv. Ca o dovadă a prețuirii contribuțiilor științifice originale, Catedrei de Histologie din București i s-a încredințat organizarea celui de Al V-lea Congres Internațional de Histochimie și Citochimie, la București, în august 1976.

În domeniul *neurohistologiei*, s-au adus contribuții originale referitor la *inervația funcțională* (adrenergică și colinergică) a *țesutului adipos alb* și a *vaselor periferice*, precum și asupra *interrelației dintre lipocite, mastocite și fibrele nervoase adrenergice sau colinergice*; de asemenea s-a stabilit că *acidul folic se acumulează iar metabolismul său scade în mod caracteristic* în ganglionul cervical superior și în nucleii de la baza creierului, în cursul procesului de senescență. Aceste lucrări au fost publicate în: *J. Neurovisceral. Rev.*, 1970, p. 25—36; *Exptl. cell. Res.*, 1969, 54, 251—253; *Acta Histochem.*, 1969, 33, 59—69; *J. Hirnforsch.*, 1979, 20, 663—670; *Histochemistry*, 1979, 62, 101—107.

În domeniul *histoenzimologiei* au fost elaborate metode *originale pentru localizarea histochimică a epimerazelor, a L-aminoacid-reductazelor, a lipoic-dehidrogenazei, a folic-reductazei acidului folic*, publicate în: *J. Histochem. Cytochem.* (1964, 12, 145; 1961, 1, 205); *Acta Histochem.* (1966, 25, 2 422); *Histochemie* (1965, 5, 450; 1968, *74*, 143); *Histochemie* (1970, *21*, 9); *Histochemie* (1967, 11, 180); *Histochem. J.* (1970, 2, 289); *Histochemie* (1975, 7, 427). Metodele sînt citate de diverși autori care au urmărit identificarea enzimelor respective și constituie capitole speciale în tratate de histochimie, cum sînt: AGE Pearse — „Histochemistry, Theoretical and Applied", vol. 2, ed. a III-a, J. and L. A. Churchill Ltd. (1972); H. Troyer — „Principles and Techniques of Histochemistry", Ed. Little, Brown and Comp., Boston, 1980.

În domeniul biologiei celulei musculare cardiace, s-au identificat modificările metabolice ale miocardului în cursul evoluției embrionare a cordului uman; s-a dovedit *rolul citomembranelor și îndeosebi al mitocondriilor în biologia și patologia celulei musculare cardiace* (în mod special rolul mitocondriei în dinamica calciului celulei normale și în imobilizarea lui în hipertrofia cardiacă). Acestea au fost publicate în: *Histochem J.* (1969, 1, 205); *Z. Zellforsch.* (1971, *121*, 181—193); *Acta Histochem. Cytochem.* (1971, 8, 191); *Exp. cell. Res.* (1971, *68*, 210—214); *Rev. Physiol.* (1972, 9, 97—102); *J. Molec. Cell. Cardiol.* (1978, 10, 1 141—1 147).

Cercetări cu rezultate similare s-au mai efectuat și asupra *țesutului muscular striat și neted*. Rezultatele în acest domeniu se bazează pe *metode originale de identificare in situ a locurilor de legare a calciului*. Aceste metode sînt citate în lucrări ca: M. A. Hayat — "Positive staining for electron microscopy". Ed. Van Nostrand Reinhold Comp., New York, 1975 sau G. Geyer — "Ultrahistochemie", G. Fischer Verlag, Jena, 1973.

În domeniul *histopatologiei acidului folic*, s-a dovedit pe de o parte că *in situ*, înaltul metabolism al acidului folic este caracteristic celulelor tinere

și celor angajate în procesul activ de diferențiere și, pe de altă parte, că în procesele leucemice au loc variații patognomonice pentru diagnostic cît și pentru estimarea eficacității citostaticelor și a evoluției maladiei. Rezultatele au fost publicate în: *Histochem J.*, 1972, 4, 87—90; *Histochemistry*, 1975, 7, 427—434; *Acta Histochem.*, 1980, *66*, 28—32.

Consecința imediată a dezvoltării unei linii moderne de cercetare, a fost faptul că la catedră s-au organizat un laborator de *histoenzimologie* și altul de *citochimie ultrastructurală* care s-au impus ca centru metodologic în țară și în străinătate. În cursul anilor '60, în laboratorul nostru s-au organizat trei cursuri succesive cu participare internațională pentru instruirea tinerilor cercetători (din țară și din străinătate) în domeniul *histoenzimologiei*. În cursul anilor '70, *laboratorul de citochimie ultrastructurală* a fost vizitat de mai mulți specialiști din străinătate iar unii au efectuat stagii de specializare pe diferite perioade de timp.

Dacă la Catedra de histologie și citologie de la Facultatea de Medicină din București au fost obținute unele rezultate notabile atît în domeniul cercetării științifice cît și în cel al activității didactice, aceasta se datorează numeroaselor cadre deosebit de valoroase care în decursul ultimilor 25 de ani au adus servicii importante domeniului organizării invizibile cu ochiul liber a corpului omenesc. Dintre cadrele care au ilustrat sau continuă să ilustreze catedra noastră voi evoca pe prof. dr. Doina Onicescu, dr. Ludmila Fotin, dr. Claudia Casian, dr. Victoria Ștefănescu, dr. Letiția Mischiu, dr. Laurențiu Mircea Popescu, dr. Nicolae Ionescu, dr. Ioana Cuida, dr. Mihai Popescu, dr. Caius T. Dragomir, dr. Vasilica Vulcan, dr. Ileana Stoica-Capătă, dr. Luminița Tașcă, dr. Aurelia Marin, dr. Carmen Ciobotaru, dr. Maria Ștoica, dr. Cristina Vidulescu. Multe din datele originale incluse în această carte sînt rezultatul muncii efectuate de-a lungul timpului în colaborare cu colegii noștri menționați aici.

*

* *

Parcurgînd cu respect și admirație drumul mai mult decît secular al histologiei românești, este, cred, potrivit să sugerez tinerelor generații că înfăptuirile înaintașilor noștri desemnează, după cum spunea Mircea Eliade *, „o istorie adevărată" și foarte prețioasă, dat fiind faptul că este „sacră, exemplară și semnificativă".

* Mircea Eliade — Aspecte ale mitului, Edit. "Univers", București, 1978, p. 1.

TEHNICA MICROSCOPICĂ

1.1. IMPORTANȚA TEHNICII MICROSCOPICE

Toate cunoștințele de care dispunem despre celule și țesuturi se datorează tehnicilor — în sensul cel mai larg al cuvîntului — de explorare a organizării invizibile cu ochiul liber a lumii vii. Existența celulelor a fost necunoscută pînă la perfecționarea lentilelor care permit observarea lor. De asemenea ultrastructura celulelor a rămas un mister pînă la descoperirea microscopului electronic. Dar nu numai tehnologia instrumentelor măritoare a avut un impact asupra dezvoltării științelor biologice, ci numeroase ramuri ale științelor tehnice fizice și chimice. Două exemple sînt edificatoare în acest sens. În primul rînd constituirea histologiei ca știință de sine stătătoare, în secolul trecut, a depins atît de perfecționarea microscopului optic cît și de elaborarea tehnologiei de prelucrare a celulelor și țesuturilor pentru a putea fi studiate la microscop. În acest scop au fost elaborate metode de *fixare*, de *secționare* (la cîțiva microni) și de *contrastare* prin coloranți. Dezvoltarea puternică, în secolul trecut, a producției de coloranți pentru industria textilă, a avut o influență hotărîtoare pentru elaborarea metodelor de colorare histologică, utilizate și astăzi în mod curent, în laboratorul de histologie și histopatologie. Al doilea exemplu este oferit de descopeirrea ultrastructurilor celulare. De la descoperirea, în anii '20 ai secolului nostru, că fasciculele de electroni pot fi focalizate, și pînă la fabricarea primului microscop electronic (Knoll și Ruska, 1931) s-au scurs mai puțin de zece ani. În schimb elaborarea tehnologiei de prelucrare a celulelor și țesuturilor pentru a putea fi studiate la microscopul electronic a necesitat încă trei decenii de cercetări, așa încît această tehnologie a fost pusă la punct spre sfîrșitul anilor '50 și începutul anilor '60.

Obiectul histologiei este acela de a înțelege nu numai microanatomia celulelor, țesuturilor, organelor, ci și de a învăța cît mai multe despre funcția lor, exprimată în termeni structurali. Metodele folosite de histologi sînt extrem de diverse. În timp ce o mare parte din conținutul cursului de histologie poate fi conceput în termeni de microscopie optică, interpretarea mai detaliată a microanatomiei se bazează pe observarea la microscopul electronic,

Scanned with OKEN Scanner

de transmisie și de baleiaj* *(scanning* **)*, deoarece asigură o mărire utilă mai mare, adică are o putere de rezoluție mai mare.

Histologia se bazează și pe procedee speciale ca: histochimia, autoradiografia, pe metode biologice cum ar fi culturile de celule, țesuturi sau organe și pe tehnici speciale microscopice pentru a vizualiza preparatul. S-ar putea ca studentul să se simtă străin de asemenea metode, deoarece practicarea lor directă îi este de cele mai multe ori inaccesibilă. Cu toate acestea, este important să cunoască valoarea procedeelor specializate și cantitatea de informație pe care ele o aduc. Acest capitol pune la dispoziție o trecere în revistă a metodelor și oferă o explicație a modului în care informațiile furnizate de aceste metode îl pot ajuta pe student să ajungă la o înțelegere judicioasă a histologiei.

1.2. PREPARAREA ȚESUTURILOR PENTRU SECȚIUNILE LA PARAFINĂ, COLORATE CU HEMATOXILINĂ-EOZINĂ

Modalitatea de obținere a unei secțiuni de țesut colorate este descrisă mai detaliat decît alte subiecte din acest capitol, deoarece acesta este tipul de preparat examinat cel mai adesea atît de student, cît și de specialiști, iar metoda se bazează pe principii care se aplică și în alte situații (tabelul 1.I)

TABELUL 1.I

Principalele etape ale obținerii unui preparat permanent

Etape		Rezultat
1. Recoltarea	biopsie intervenție chirurgicală necropsie	eșantion de țesut cu grosimea de 1 cm
2. Fixarea	formol 10% Bouin	conservarea structurilor
3. Spălarea	apă distilată	deshidratare
4. Deshidratarea	alcool 70°—80°—90°—100°	îndepărtarea fixatorului
5. Clarificarea	xilen sau alți solvenți ai parafinei	pregătirea țesutului pentru includere
6. Includerea	xilen + parafină topită parafină topită	prin solidificare și modelare rezultă un bloc paralelipipedic
7. Secționarea	microtom	secțiuni cu grosimea de cîțiva microni
8. Dizolvarea parafinei	xilen	
9. Hidratarea	alcool 100°, 90°, 80°, 70° apă distilată	
10. Colorarea	coloranți în soluție apoasă sau alcoolică	
N.B. Cînd colorantul se află în soluție alcoolică nu mai e necesară hidratarea		
11. Deshidratarea	alcool 70°, 80°, 90°, 100°	
12. Clarificarea	xilen	
13. Montarea	balsam de Canada lamelă	
14. Etichetarea		

* *Balayage* (fr.) măturare.
** *Scanning* (engl.) explorare.

Scanned with OKEN Scanner

După *recoltare*, prima operațiune pentru prepararea unui eșantion de țesut pentru examinare este *fixarea*. Aceasta conservă structura țesutului și îl pregătește pentru viitoarele etape ale preparării. Numeroase substanțe sau amestecuri de substanțe sînt folosite ca fixatori. Unul din cei mai utilizați este formaldehida, a cărei soluție apoasă se numește formol. Formolul poate fi folosit simplu, împreună cu soluții-tampon sau în combinație cu alți fixatori. Formaldehida reacționînd cu grupările amino- ale proteinelor, constituie un bun fixator pentru conservarea structurii generale a citoplasmei și a nucleului, datorită conținutului lor în proteine. După ce țesutul a fost fixat, fixatorul este îndepărtat din preparat prin *spălare*. Apoi țesutul este *deshidratat*, în așa fel încît să poată fi *inclus* într-o substanță consistentă și nemiscibilă cu apa, ca parafina, pentru a fi secționat. Deshidratarea se face prin trecerea țesutului printr-o serie de alcooluri cu concentrație gradat crescîndă, pînă la 100%. Apoi țesutul este plasat într-un lichid neapos, ca xilenul, care este miscibil cu parafina topită. După aceea țesutul este impregnat cu parafină topită și lăsat să se răcească și să se solidifice. Parafina solidificată, conținînd țesutul, este ajustată, modelată într-o formă de bloc paralelipipedic, după care se montează la un aparat de secționat, numit microtom, și se *taie secțiuni* de țesut cu grosimea de cîțiva microni. Secțiunile se așază pe o lamă, cu o cantitate mică de albumină servind drept adeziv. Ele nu pot fi încă studiate la microscopul optic, deoarece țesutul este infiltrat cu parafină și necolorat. Parafina se dizolvă (de exemplu cu xilen) iar țesutul este rehidratat, fiind trecut printr-o serie de alcooluri cu concentrație gradat descrescîndă și în apă. Apoi țesutul este *colorat* cu hematoxilină și eozină sau prin alte metode de colorare. În acest moment, lama încă nu poate fi examinată la microscopul optic și nici păstrată. Pentru a obține un preparat permanent, secțiunea de țesut colorată trebuie din nou deshidratată în alcooluri și, folosind un mediu de montare neapos, acoperită cu o lamelă. Cînd mediul de montare se usucă, preparatul este gata pentru examinare la microscop și poate fi păstrat timp nedefinit. Rezultatele colorației hematoxilină-eozină (HE) sînt prezentate în tabelul 1.II.

TABELUL 1. II

Rezultatele colorației hematoxilină-eozină

Componente celulare și extracelulare	Culoarea
Nucleu	
Heterocromatina	albastru-violet
Eucromatina	slab reactivă
Nucleolul	albastru
Citoplasma	
Ergastoplasma (RER)	albastru
Filamente citoplasmatice	roz
Restul citoplasmei	roz
Material extracelular	
Fibre de colagen	roz-intens
Fibre elastice	roz } dar nu se pot distinge de fibrele de colagen
Fibre de reticulină	roz } dar nu se pot distinge de fibrele de colagen
Substanța fundamentală	albastru-palid
Matricea cartilaginoasă	roz
Matricea osoasă decalcifiată	roz
Membrana bazală	

Scanned with OKEN Scanner

1.3. METODE GENERALE DE COLORARE

În general hematoxilina și eozina sînt folosite în histologie pentru că evidențiază elemente structurale, fără să dea informații exacte asupra caracteristicilor chimice ale secțiunilor de țesuturi. Deși foarte utilă, această colorație nu evidențiază selectiv anumite structuri, printre care fibrele elastice, fibrele de reticulină, membranele bazale, sau nu le evidențiază deloc (lipidele). Pentru a le evidenția se folosesc alte metode de colorare, multe dintre ele selective. Dintre acestea menționăm *orceina* și *rezorcin-fucsina* pentru fibrele elastice, *impregnarea argentică* pentru fibrele de reticulină și membranele bazale. Principiul chimic al acestor metode nu a fost bine elucidat dar ele și-au dovedit utilitatea. Lipidele pot fi evidențiate prin procedee selective, dar cu utilitate limitată; pentru a le evidenția trebuie evitată, la obținerea preparatului, folosirea de solvenți ai grăsimilor (solvenții parafinei sînt și solvenți ai grăsimilor). De aceea, se folosesc secțiuni la gheață ale țesuturilor fixate în formol și coloranți solubili în grăsimi. Din această categorie fac parte coloranții denumiți generic *Sudan*. Colorantul este preparat într-un solvent pentru care are mai puțină afinitate, de exemplu alcool 70°, și aplicat pe secțiunea obținută la gheață. Colorantul trece în lipide, pentru care manifestă afinitate mai mare decît pentru solventul său. Glicerina este folosită ca mediu de montare. Procedeul descris servește la evidențierea lipidelor neutre, ca de exemplu trigliceridele, depozitate sub formă de picături lipidice în citoplasma celulelor adipoase. Lipidele complexe, ca fosfolipidele din membrane, necesită alte procedee de evidențiere.

1.4. HISTOCHIMIA

Pe lîngă procedeele menționate, histologia recurge la metode cu specificitate chimică față de anumite componente ale țesuturilor. Acestea aduc informații mai detaliate despre țesuturi și, adesea, despre funcția celulelor și a componentelor extracelulare ale țesuturilor. Procedeele chimice care implică folosirea coloranților, enzimelor, anticorpilor, izotopilor radioactivi etc. constituie acea ramură a tehnicii histologice numită *histochimie*, respectiv citochimie. De multe ori metode optice speciale sînt folosite împreună cu metoda citohistochimică, de exemplu în *imunocitochimie*. Unele metode citohistochimice pot fi folosite nu numai la microscopul optic, ci și la microscopul electronic. Înainte de a prezenta, pe scurt, cîteva metode citohistochimice, considerăm util să precizăm ce conține din punct de vedere chimic o secțiune de țesut.

1.4.1. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A SECȚIUNILOR DE ȚESUTURI

Compoziția chimică a unei secțiuni de țesut dintr-un preparat permanent diferă considerabil de cea a țesutului viu. Multe componente ale țesutului se pierd în timpul prelucrării. Componentele ce se conservă după tratarea cu fixatori constau în mare parte din molecule mari, greu solubile, unele aso-

Scanned with OKEN Scanner

ciate între ele pentru a forma complexe macromoleculare. Exemple de complexe macromoleculare sînt: nucleoproteinele formate din acizii nucleici, complexați cu proteine; proteinele intracelulare ale citoscheletului; proteinele extracelulare, formate din numeroase molecule identice, asociate prin legături transversale, formînd agregate insolubile (de exemplu, fibrele de colagen); fosfolipidele din membrane, unele de asemenea complexate cu proteine sau glucide. În cea mai mare parte, aceste molecule constituie structura celulelor și țesuturilor, în sensul că ele alcătuiesc elementele tisulare organizate, recunoscute ca structuri la microscopul optic sau electronic. Trebuie subliniat faptul că, de multe ori un element structural este în același timp o unitate funcțională. De exemplu, în cazul proteinelor care formează filamentele contractile ale celulelor musculare, filamentele reprezintă componente structurale vizibile și, în același timp, substratul efectiv al contracției musculare. ARN-ul din citoplasmă este vizualizat ca parte componentă a unor structuri — ribozomii liberi sau asociați reticulului endoplasmic rugos (ergastoplasma din celulele secretorii; corpii Nissl din neuroni) — și în același timp este, împreună cu celelalte componente ale ribozomului, substratul efectiv al sintezei de proteine în celulă. Unele componente tisulare, ca proteinele mici, acizii nucleici mici (exemplu ARNt) se pierd în cursul prelucrării țesutului; se pot pierde de asemenea și molecule mari. De pildă ele pot fi hidrolizate la un pH nefavorabil al soluției fixatoare. Exemple de macromolecule ce nu se conservă prin fixarea de rutină cu fixatori apoși sînt glicogenul (forma de depozit intracelular a glucozei), proteoglicanii și glicozaminoglicanii din substanța fundamentală. Ei pot fi conservați ca fixatori neapoși pentru glicogen sau prin adăugarea la soluția fixatoare a unor agenți stabilizatori, ce se leagă specific de moleculele conținătoare de glucide ale substanței fundamentale. Așa cum am afirmat, și lipidele se pierd în preparatele de rutină, din cauza tratării cu solvenți organici. Ele se conservă cu ajutorul metodelor care evită acest moment al preparării. Toate moleculele mici, solubile și ionii se pierd din țesuturi în preparatele de rutină. Apa, metaboliții intermediari, glucoza, sodiul, clorul și alte substanțe similare se pierd. Preparate speciale pot conserva aceste molecule mici și ionii, dar cu o considerabilă pierdere a integrității structurilor tisulare. Aceste substanțe cu molecule mici, care nu contribuie la crearea arhitecturilor tisulare stabile, participă la reacții, sînt transformate și au o viață relativ scurtă. Apa, cu o moleculă extrem de versatilă, ia parte la reacțiile biochimice, dar, în același timp, contribuie și la stabilizarea structurilor.

1.4.2. BAZELE CHIMICE ALE COLORĂRII

Hematoxilina și eozina sînt coloranții cei mai folosiți în histologie. Eozina este un colorant acid ale cărui proprietăți colorante pot fi explicate pe baza teoriei acțiunii coloranților acizi. Hematoxilina nu este un colorant bazic, dar colorează în mod asemănător unui colorant bazic. Un colorant bazic este o moleculă colorantă care poartă sarcini pozitive pe partea colorată a moleculei. Ea este desemnată prin formula generală R^+Cl^-, unde R^+ este cationul colorat. Un colorant acid poartă sarcini negative pe porțiunea colorată a moleculei. Este desemnat prin formula generală Na^+R^-, unde R^-

Scanned with OKEN Scanner

este anionul colorat. Culoarea colorantului nu este legată de proprietatea lui de a fi acid sau bazic*, așa cum reiese din tabelul 1.III.

Coloranții bazici reacționează cu grupările anionice ale componentelor tisulare. Acestea includ grupările fosfat ale acizilor nucleici (ADN, ARN), grupările sulfat ale glicozaminoglicanilor, grupările carboxil ale proteinelor.

TABELUL 1.III

Caracterul și culoarea unor coloranți

Coloranți bazici	Culoare	Coloranți acizi	Culoare
Albastru de toluidină	albastru	Oranj G	oranj
Albastru de metilen	albastru	Fucsina acidă	roșu
Verde de metil	verde	Eozina	roșu
Pironină G	roșu	Albastru de anilină	albastru

Reacția grupărilor anionice variază în funcție de pH. La pH mare (aproximativ 10) toate cele trei grupări sînt ionizate și disponibile pentru a se lega electrostatic cu colorantul bazic; la pH ușor acid sau neutru (5—7), grupările sulfat și fosfat sînt ionizate și capabile de a reacționa cu coloranții bazici; la pH scăzut (sub 4) numai grupările sulfat rămîn ionizate și reacționează cu coloranții bazici. Astfel, colorarea cu coloranți bazici la un pH controlat, poate fi folosită pentru a pune în evidență o anumită grupare anionică, grupare care, fiind situată pe o anumită macromoleculă, servește ca indicator al acelei macromolecule. Un procedeu ajutător, folosit împreună cu colorarea la pH controlat este asocierea enzimelor, pentru a îndepărta în mod selectiv unele substanțe din țesut, reprezentate de substratul acestora, înainte de colorare.

Repetăm că hematoxilina nu este un colorant bazic. Ea este folosită împreună cu un *mordant*, adică o substanță care formează o legătură intermediară între colorant și substrat. Mordantul îi conferă hematoxilinei proprietățile unui colorant bazic. Legăturile în complexul țesut-mordant-hematoxilină nu sînt numai electrostatice și, cînd este plasat în apă, hematoxilina nu disociază de țesut, ci rămîne fixată. De aceea hematoxilina se pretează la secvențe de colorare în care ea este urmată de eozină sau de alți coloranți acizi. Coloranții bazici tipici nu pot fi folosiți într-o asemenea colorare succesivă, urmați de un colorant acid, deoarece colorantul bazic are tendința de a disocia de țesut în timpul spălării ulterioare cu soluții apoase.

Coloranții acizi se leagă de componentele tisulare prin legături electrostatice, în mod similar și opus coloranților bazici. Ei reacționează cu grupările cationice, adică cu grupările amino-ionizate ale proteinelor. Deși legătura electrostatică are un rol major în legarea colorantului de țesut, totuși nu este singura legătură; de aceea coloranții acizi sînt folosiți cîteodată în combinații, fiecare dintre ei colorînd selectiv o anumită structură. De exemplu, trei coloranți acizi sînt folosiți în tehnica Mallory — albastru de anilină, fucsină

* Coloranții sînt săruri neutre. Denumirea de „acid" sau „bazic" reflectă caracterul ionului purtător de culoare din moleculă, după disocierea colorantului în soluție.

acidă și oranj G. Acestea colorează selectiv colagenul, citoplasma și, respectiv, hematiile. Fucsina acidă colorează și nucleii. În alte colorații multiple, hematoxilina este folosită pentru a evidenția întîi nucleii, după care coloranții acizi au rolul de a evidenția citoplasma și fibrele din matricea extracelulară. Colorarea selectivă a componentelor tisulare cu coloranți acizi nu se datorează unor proprietăți ce le conferă specificitate, ci mai degrabă unor factori relativi, ca de pildă mărimea moleculelor colorantului și gradul lor de agregare sau permeabilitatea și densitatea țesutului. Și coloranții bazici pot fi folosiți în combinații, dar acestea nu sînt atît de frecvent utilizate ca acelea ale coloranților acizi.

Orice component tisular care reacționează cu un colorant bazic (sau cu hematoxilina) se numește *bazofil* și are proprietatea de *bazofilie*. Componentele tisulare ce se colorează cu coloranți bazici sînt heterocromatina și nucleolul (ambele datorită conținutului în grupări fosfat), unele componente ale citoplasmei ca reticulul endoplasmatic rugos (datorită grupărilor fosfat ionizate), componente extracelulare ca matricea cartilaginoasă (datorită grupărilor sulfat ionizate). Componentele tisulare ce se colorează cu coloranți acizi sînt *acidofile*, deci demonstrează *acidofilie*. Acestea sînt: filamentele citoplasmatice, restul citoplasmei, fibrele extracelulare (datorită grupărilor amino-ionizate).

N.B. Există și coloranți neutri, săruri în care ambii radicali — atît anionul cît și cationul — sînt coloranți, cu formula generală $R^+—R^-$. Ei se leagă în mod complex de substrat, în funcție de pH-ul mediului. Astfel este eozinatul de albastru de metilene folosit în colorația May-Grünwald-Giemsa pentru colorarea frotiurilor de sînge. Structurile cu afinitate pentru coloranți neutri sînt *neutrofile*. Exemplu: granulațiile neutrofile ale polimorfonuclearelor.

Metacromazia este fenomenul prin care unii coloranți (exemplu albastru de toluidină) își schimbă culoarea, după ce au reacționat cu un component tisular. Substratul fenomenului este prezența polianionilor în țesut. Cînd țesutul este colorat cu o soluție concentrată de colorant, moleculele de colorant ce se leagă de grupările anionice sînt suficient de aproape pentru a forma agregate, ale căror proprietăți de absorbție a luminii vizibile diferă de cele ale moleculelor neagregate. Metacromazia reflectă prezența în țesut a grupărilor anionice numeroase și așezate la distanță mică una de alta, așa ca în matricea cartilajului (glicozaminoglicani) și în granulele mastocitelor (heparina).

1.4.3. REACȚIA ÎNTRE REACTIVUL SCHIFF ȘI GRUPĂRILE ALDEHIDICE

Există două aplicații bine cunoscute ale reactivului Schiff în histochimie: una este reacția Feulgen pentru ADN iar cealaltă, reacția PAS (periodic acid-Schiff) pentru glucide sau macromolecule cu grupări glucidice.

În *reacția Feulgen* hidroliza acidă blîndă cu acid clorhidric clivează grupările purinice de dezoxiriboză. Dezoxiriboza se desface apoi, formînd grupări aldehidice, care, la rîndul lor, reacționează cu reactivul Schiff, colorîndu-se în roșu-purpuriu. Reacția este specifică pentru ADN, deoarece hidroliza cu acid clorhidric produce numai ruperea dezoxiribozei, nu și a ribozei. De aceea, ARN nu reacționează în această tehnică.

Scanned with OKEN Scanner

Un procedeu de control folosit de histochimiști este digerarea prealabilă a unui substrat specific, cu ajutorul enzimei corespunzătoare, pentru a îndepărta substratul respectiv, urmată de colorare. Astfel, după tratarea unui țesut cu dezoxiribonuclează, care digeră specific ADN, reacția Feulgen va fi negativă. Reacția Feulgen evidențiază ADN-ul din cromatină și ADN-ul care poate fi prezent în fagozomii macrofagelor. ADN-ul mitocondrial nu este prezent în concentrație suficientă pentru a pozitiva reacția Feulgen.

Reacția PAS servește la detectarea glicogenului și a moleculelor ce conțin glucide. Ea se bazează pe faptul că ciclurile hexozelor conțin atomi de carbon apropiați, fiecare legat de o grupare hidroxil, iar hexozaminele din glicozaminoglicani conțin carboni apropiați, dintre care unul are o grupare hidroxil iar altul, o grupare amino-.

Acidul periodic rupe legătura între acești atomi de carbon adiacenți și formează grupări aldehidice, care, la rîndul lor, reacționează cu reactivul Schiff. Deoarece multe componente tisulare dau o reacție PAS-pozitivă, trebuie folosite anumite procedee pentru identificarea anumitor substanțe PAS-pozitive. Pentru glicogen se recurge la tratarea țesutului cu amilază, enzimă care îl descompune specific. Astfel materialul PAS-pozitiv din celulă, care devine areactiv prin tratare cu amilază, este identificat ca glicogen. În mod similar, se identifică polizaharidele complexe din substanța fundamentală, dar procedeul este mai complicat, necesitînd mai multe enzime. Reacția PAS servește de asemenea la identificarea componentelor membranei bazale și a fibrelor de reticulină. Fiecare din aceste structuri conține molecule cu grupări glucidice PAS-pozitive, dar fiecare are o localizare specifică. Reacția PAS-pozitivă corelată cu localizarea contribuie la identificarea lor. Astfel, banda PAS-pozitivă dintre baza epiteliilor și țesutul conjunctiv subiacent este membrana bazală. Reacția PAS și impregnarea argentică sînt metodele de evidențiere a membranei bazale și a fibrelor de reticulină.

1.4.4. ENZIMELE

Așa cum am arătat, enzimele pot fi folosite ca reactivi de control în procedeele histochimice. În plus, un întreg capitol al histochimiei se ocupă cu localizarea activității enzimatice în celule și țesuturi. Aceste metode vizualizează produșii de reacție ai activității enzimatice și nu enzima însăși. Într-o reacție tipică pentru evidențierea unei enzime hidrolitice, secțiunea de țesut este pusă într-o soluție conținînd substratul AB și un agent de captare (T), care va precipita unul dintre produșii de reacție, conform ecuației:

$$AB + T \xrightarrow{\text{enzima}} AT\downarrow + B$$

În histochimia enzimelor, este important să se evite inactivarea enzimei prin acțiunea fixatorului și să se înlăture condițiile care conduc la localizări false. Una din cele mai folositoare metode este cea de detectare a fosfatazei acide, enzimă localizată în lizozomi. Astfel pot fi identificați lizozomii la microscopul optic și la microscopul electronic. Au intrat în uzul curent metodele pentru ATP-ază, fosfataza alcalină, enzimele oxidoreducătoare ale lanțului respirator și multe altele.

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul 1. IV sînt enumerate metodele clasice de colorare și histoenzimologice, împreună cu rezultatele lor (planșele 1 - 6).

TABELUL 1.IV

Metode uzuale de colorare și metode histoenzimologice

Metoda	Substratul	Rezultate
1	2	3
Hematoxilină și eozină (HE)	structura generală	nucleul — albastru-violet citoplasma și colagenul — roz citoplasma bazofilă și matricea cartilaginoasă — albastru granulele enozinofile — roșu, cărămiziu
(Hematoxilina poate fi folosită singură, colorînd nucleii în albastru-violet. Există variante, ca hematoxilina ferică, cu care nucleii se colorează în negru-cenușiu.)		
Van Gieson (colorație tricromă)	structura generală	nucleul — negru-cenușiu citoplasma — galbenă cologenul-roșu
Mallory (colorație tricromă)	structura generală	nucleii — negru-albăstrui citoplasma — roșu-violet hematiile — cărămiziu colagenul — albastru
Masson (colorație tricromă)	structura generală	nucleii — negru citoplasma — roșu-violet colagenul și mucusul — verde
(Există multe variante ale *colorațiilor tricrome* cu rezultate ușor diferite.)		
Albastru de toluidină	secțiuni incluse în masă plastică	toate structurile — nuanțe de albastru granulele mastocitelor — violet (metacromazie)
Carmin	țesuturi embrionare	nucleul — roșu alte componente — nuanțe deschise de roșu
Azocarmin-anilină (Azan)	structură generală	nucleul — roșu citoplasma — roz colagenul — albastru
Hematoxilină — acid fosfotungstic	mușchi striat	nucleul și striațiile fibrei musculare — albastru colagenul — albastru

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1 IV (continuare)

1	2	3
Orceina — verde-lumină	țesut conjunctiv	nucleul — verde-palid colagenul — verde fibrele elastice — negru sau maron granulele mastocitelor — roșu
(Orceina poate fi folosită fără verde-lumină, colorînd fibrele elastice în brun sau negru.)		
May-Grünwald-Giemsa	frotiuri de sînge	nucleul — roșu-violet citoplasma bazofilă — albastru-palid citoplasma acidofilă — roz granule neutrofile — roșu-violet granule eozinofile — cărămiziu granule bazofile — negru-violet hematii — cărămiziu
PAS-hematoxilină	glucide	nucleul — albastru mucus, glicozaminoglicani și glicogen — roșu-violet
Verde de metil-pironină	acizi nucleici	cromatină (ADN) — verde nucleolul și ARN-ul citoplasmatic — roșu
Violet de crezil	țesut nervos	corpii Nissl — violet
Koele-Gömöri, metodă pentru colinesteraze	țesut nervos	locul cu activitate colinesterazică — brun
Sudan B Sudan III Sudan IV	lipide	— negru — portocaliu — roșu
Tetraoxid de osmiu	lipide, țesut nervos	lipide, inclusiv mielina — negru
Impregnarea argentică	țesut nervos, fibre de reticulină, membrane bazale	— negru
(Există multe variante ale metodei de impregnare argentică, fiecare din ele avînd selectivitate pentru anumite structuri.)		
Gömöri, metodă pentru hidrolaze — fosfataza alcalină — fosfataza acidă	nefrocite lizozomi	locul de acțiune a enzimei apare în negru
Pearse, metodă pentru dehidrogenaze — LDH — SDH	hialoplasmă mitocondrii	H^+ rezultat din acțiunea enzimei reduce sărurile de tetrazoliu și rezultă granule violete de „formazan"

Scanned with OKEN Scanner

1.4.5. IMUNOCITOCHIMIE

Dacă se injectează unui animal de experiență o substanță străină, sistemul imun al acestuia produce anticorpi, ca răspuns la substanța injectată. Anticorpii reacționează specific cu substanța injectată (numită antigen, datorită capacității sale de a stimula formarea anticorpilor). Reacția între antigen și anticorp este substratul metodelor imunocitochimice. Vom descrie unul din procedee: se izolează proteina pe care vrem să o investigăm (de exemplu, actina) dintr-o sursă oarecare (de exemplu, mușchi striat de șoarece)

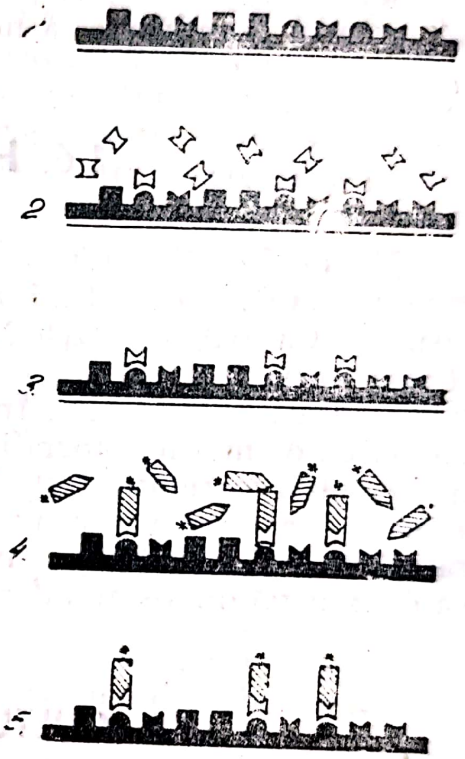


Fig. 1.1. — Imunofluorescența. Metoda indirectă. *1* — reprezentare schematică a situsurilor antigenice de pe suprafața unui țesut; *2* — țesutul este pus în prezența anticorpilor specifici pentru anumite structuri, obținuți prin imunizarea unui animal de experiență; *3* — țesutul este spălat de anticorpii în exces; rămîn numai anticorpii legați specific; *4* — țesutul este pus în contact cu anti-anticorpi, marcați cu o substanță fluorescentă; *5* — excesul de anti anticorpi marcați este îndepărtat prin spălare. Rămîn numai anticorpii legați specific; fluorescența indică localizarea antigenului din țesut (metoda directă implică marcarea directă cu substanța fluorescentă a anticorpilor specifici pentru structuta cercetată).

și se injectează unui animal de altă specie. Actina (antigen) stimulează formarea de anticorpi anti-actină, care circulă prin sîngele animalului. Anticorpii sînt izolați, legați de o substanță fluorescentă și folosiți pentru a explora țesuturile (celulele) în care bănuim prezența actinei, de exemplu fibroblastul. Dacă actina este prezentă, anticorpii se leagă de ea, iar reacția devine vizibilă datorită substanței fluorescente legată de anticorpi (fig. 1.1). Pentru a pune în evidență reacția, se folosește microscopul de fluorescență. Anticorpii se pot conjuga și cu alte substanțe ca feritina (molecula ce conține fier) pentru a vizualiza localizarea reacției antigen-anticorp la microscopul electronic.

1.5. AUTORADIOGRAFIA

Autoradiografia folosește o emulsie fotografică, întinsă peste o secțiune de țesut, pentru a localiza materialul radioactiv din țesut. Procedeul constă din injectarea unor molecule precursoare, de care celulele au nevoie pentru a sin-

tetiza molecule mari ca ADN și colagen. De exemplu, timidina e folosită de celule pentru sinteza de ADN. În practică, timidina radioactivă (tritiată) este injectată unui animal. Celulele care sintetizează ADN folosesc timidina tritiată și devin radioactive. Țesutul este prelucrat în maniera obișnuită pînă la operațiunea de întindere a secțiunii pe lamă. În acest punct, în camera obscură, lama cu secțiunea de țesut este cufundată într-o emulsie fotografică și ținută timpul necesar pentru ca radiația izotopului (în acest caz, particulele beta de joasă energie emise de timidina tritiată) să impresioneze emulsia fotografică. Apoi, emulsia fotografică este developată și granule negre de argint indică localizarea componentului tisular radioactiv. Țesutul poate fi colorat, dacă nu a fost deja, deshidratat în alcooluri, acoperit cu lamele și examinat la microscopul optic.

Autoradiografia se poate realiza folosind secțiuni subțiri de masă plastică, prentru examinarea la microscopul electronic de transmisie.

1.6. HISTORADIOGRAFIA

Historadiografia este o microradiografie cu raze X a unui preparat întins pe lamă. Ea evidențiază diferențele de densitate, ca și o radiografie obișnuită. Cu toate că razele X pot fi folosite pentru examinarea părților moi, cel mai frecvent se utilizează la examinarea secțiunilor șlefuite de os sau a altor țesuturi mineralizate. În practică, secțiunea șlefuită de os este pusă în contact cu o emulsie fotografică, pe o lamă de sticlă, și expusă la radiații X. Apoi emulsia fotografică este developată și privită la microscop. Un standard de masă cunoscută poate fi adăugat pe aceeași lamă sau pe o lamă-martor tratată în același mod, pentru a da informații semicantitative despre cantitatea de mineral din os, în diferite regiuni ale secțiunii șlefuite.

1.7. CULTURI DE ȚESUTURI ȘI CULTURI DE CELULE

Pentru a studia activitățile celulelor și țesuturilor *vii*, care nu pot fi urmărite *in vivo*, au fost concepute metode de a menține viabile celulele și țesuturile în condiții artificiale, de laborator. În practică, aceste metode *in vitro* încearcă să simuleze condițiile din organism, prin crearea unui mediu fizic și chimic în care să fie satisfăcute principalele cerințe ale celulelor și țesuturilor.

În absența circulației sanguine, celulele și țesuturile în cultură trebuie să se bizuie numai pe difuziunea pasivă pentru schimburi de gaze, metaboliți și produse de excreție, deci schimbul prompt între suprafața celulei și mediul înconjurător devine esențial. Pentru culturile de țesuturi sau organe aceasta se realizează simplu, tăind țesutul în fragmente mici.

Pentru cultura îndelungată a celulelor se obișnuiește ca celulele să fie separate din țesuturi prin incubarea acestora cu enzime proteolitice. Enzimele mai des folosite sînt colagenazele bacteriene (care digeră componentele țesutului conjunctiv ce încapsulează și susține majoritatea organelor) și tripsina

Scanned with OKEN Scanner

(o protează din pancreas care digeră componentele adezive ale suprafeței celulare). Astfel, se pot obține suspensii de celule viabile din majoritatea țesuturilor. Suspensia de celule ce conține diferite tipuri celulare este apoi purificată prin centrifugare sau sedimentare gravitațională. Acest din urmă procedeu constă din depunerea blîndă a suspensiei pe suprafața unui gradient de albumină; celulele se depun încet în soluția de albumină, oprindu-se la diferite înălțimi, în funcție de densitatea lor.

1.7.1. MEDIILE DE CULTURĂ ȘI CONDIȚIILE DE CREȘTERE

Mediile de incubație folosite pentru a menține celulele și țesuturile în culturi conțin ionii anorganici esențiali (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^- PO_4^{2-}), glucoză, aminoacizi, vitamine, împreună cu O_2 dizolvat și un tampon care să mențină pH-ul în limite fiziologice (7,2—7,4), la temperatura corpului de 37°C. Celulele cultivate pot fi menținute într-o asemenea soluție salină echilibrată pe o durată de ore. Pentru termene mai lungi și pentru creșterea și proliferarea lor este necesar adaosul de extract proaspăt de țesut (ser sau țesut embrionar). Nu a fost posibil, pînă acum, să se identifice toate componentele esențiale ale acestor extracte, necesare pentru creștere și diviziune, deși este probabil că prezența hormonilor (mai ales steroizii și insulina) are importanță majoră. Recent, au fost izolați și identificați un număr de factori de creștere capabili să stimuleze diviziunea celulelor. Aceștia sînt extrem de puternici și în stare să declanșeze procesul de diviziune, chiar în absența altor aditive, ca serul. Mai mult, acțiunea lor este specifică pentru anumite tipuri celulare. Astfel, au fost identificați un factor de creștere epidermic și un factor de creștere fibroblastic, un factor de creștere ovarian, un factor de creștere al condrocitelor etc. (vezi capitolul 3). Structura moleculară a acestora constituie obiectul unor cercetări intense. A fost izolat și un factor de creștere a nervilor, dar efectul său asupra celulelor nervoase în cultură este acela de a stimula creșterea și ramificarea, mai degrabă decît diviziunea.

O caracteristică foarte utilă pe care o capătă celulele în cultură este aceea de a crește într-un singur strat. Acest aranjament în monostrat permite examinarea lor directă la microscopul în contrast de fază.

Folosind metode uzuale de cultură, este posibilă, de exemplu, creșterea și examinarea celulelor musculare cardiace care se contractă ritmic și a macrofagelor care fagocitează activ. S-au obținut *in vitro* sisteme în care țesutul nervos crește, inervînd țesutul muscular cultivat în același mediu. Organele pot fi și ele cultivate pornind de la rudimentele embrionare. De exemplu, un os mic poate fi menținut în cultură și întreținut să crească. Această tehnică permite studiul unor factori ce influențează dezvoltarea organelor, în condiții mult mai simple decît cele din organismul viu. Totuși, termenul „cultură de organe" se referă la cultura unor fragmente de organe menținute în condiții care să prezerve intactă arhitectura organelor respective.

Culturile au fost folosite pentru studiul metabolismului celulelor normale și canceroase. Această tehnică este foarte utilă în experimentele cu virusuri care proliferează numai în interiorul celulelor. De asemenea unele protozoare au fost studiate pe culturi de țesuturi, pentru a observa dezvoltarea lor în interiorul citoplasmei.

Scanned with OKEN Scanner

În citogenetică, culturile de țesuturi permit studiul mitozelor și al cromozomilor în celulele umane. Determinarea cariotipului (numărul și morfologia cromozomilor unui individ) se realizează prin cultivarea celulelor sanguine. Examinînd aceste celule în timpul diviziunii mitotice se pot detecta eventualele anomalii ale numărului și morfologiei cromozomilor, stabilindu-se diagnosticul unor boli determinate de aceste anomalii.

S-au dezvoltat noi tehnici care permit izolarea de populații pure de celule de un anumit tip, cum sînt celulele pancreatice exocrine, celulele hepatice, celulele parietale ale mucoasei gastrice etc.

Celulele canceroase, de obicei asociate cu vase sanguine și celule conjunctive, pot fi studiate în prezent pe preparate conținînd în exclusivitate celule.

1.7.2. DEDIFERENȚIERE, LINII CELULARE ȘI ÎMBĂTRÎNIREA CELULARĂ

Deși metodele *in vitro* sînt mult folosite în cercetarea biologică a celulei, totuși e bine de știut că celulele ce se adaptează la condițiile de cultură își pierd cu timpul multe din caracteristici. De exemplu, celulele hipofizei sau celulele hepatice supraviețuiesc ca celule diferențiate în cultură mai multe zile sau săptămîni, dar apoi se dediferențiază, pierzîndu-și organizarea structurală caracteristică și posibilitatea de a îndeplini funcții specializate ca sinteza și secreția de hormoni. Celulele ce se dezvoltă cel mai bine în cultură sînt cele de tipul fibroblaștilor, cu o organizare celulară mai nespecifică.

Cu toate acestea, numeroase tipuri de celule pot fi cultivate, cresc și se divid *in vitro* timp de mulți ani. Există deja un număr de linii celulare, bine stabilite, care au luat naștere în acest fel. Ele au devenit perfect adaptate la mediu *in vitro* și sînt capabile de autoperpetuare pe o perioadă nedefinită (par capabile să dea naștere unui număr nedefinit de generații), dar aceste celule au întotdeauna caracteristici anormale — de obicei un număr de cromozomi schimbat. Liniile normale, în care celulele par în toate privințele identice cu tipul celular din organismul viu, pot prolifera cu succes, dar ele sînt capabile de un număr limitat de diviziuni. Pentru celulele umane, aproximativ 50 de diviziuni succesive constituie regula, și cu cît donatorul este mai în vîrstă, cu atît numărul de diviziuni e mai mic. Datorită caracteristicilor menționate, aceste preparate au fost folosite ca model al procesului de îmbătrînire la nivel celular. Liniile celulare ce pot prolifera pe o durată de timp nedefinită sînt foarte ușor de întreținut și utile pentru diferite tipuri de experimente, ca testarea efectului toxicelor și carcinogenilor.

Celulele canceroase izolate și cultivate dau linii celulare „nemuritoare", în care rămîn deseori unele caractere ale celulei de origine. Posibilitatea de a hibrida (fuziona) acest tip de celule cu o celulă diferențiată și de a combina avantajele amîndorura este un domeniu de cercetare curent.

1.8. FRACȚIONAREA CELULARĂ

Dat fiind că este vorba de tehnici statistice, utilitatea majorității analizelor biochimice depinde direct de puritatea preparatului studiat. Deci, pentru caracterizarea biochimică a componentelor celulare și subcelulare este

Scanned with OKEN Scanner

necesară folosirea unor metode preparatorii, ca fracționarea celulară, care permite ca orice organit sau alt component celular să fie analizat separat de celelalte componente celulare. Deși nici o metodă de fracționare nu dă fracțiuni de o puritate perfectă, totuși gradul mic de contaminare permite studierea caracterelor biochimice ale majorității structurilor.

În majoritatea metodelor de rutină țesutul este dezagregat și apoi constituenții săi sînt separați prin centrifugare. Metoda de dezagregare variază, dar de obicei ea duce la ruperea membranelor celulei, păstrînd nucleii și mitocondriile intacte. Procesul se numește omogenizare, iar suspensia de componente celulare obținută se numește omogenat.

În practică, organul sau țesutul recoltat de la un animal sacrificat recent, se taie în fragmente foarte mici care se pun într-o soluție adecvată. Cel mai adesea este folosită sucroza cu concentrația 0,25 M, dar densitatea și vîscozitatea mediului pot să varieze. Fragmentele de organ conținute în soluție se pun într-un cilindru de sticlă, în interiorul căruia se află un bastonaș de sticlă care se învîrtește cu viteză mare (fig. 1.2). Fragmentele de țesut sînt strivite prin frecarea bastonașului de peretele cilindrului și astfel, prin ruperea membranelor celulare, se eliberează organitele și incluziunile în soluție. Ca urmare a ruperii lor în mici fragmente, membranele, respectiv membrana plasmatică și membrana reticulului endoplasmic, se reunesc imediat, formînd vezicule sferice numite microzomi. Astfel, țesutul este transformat într-o „supă" care conține mai multe clase de particule mărginite de membrană,

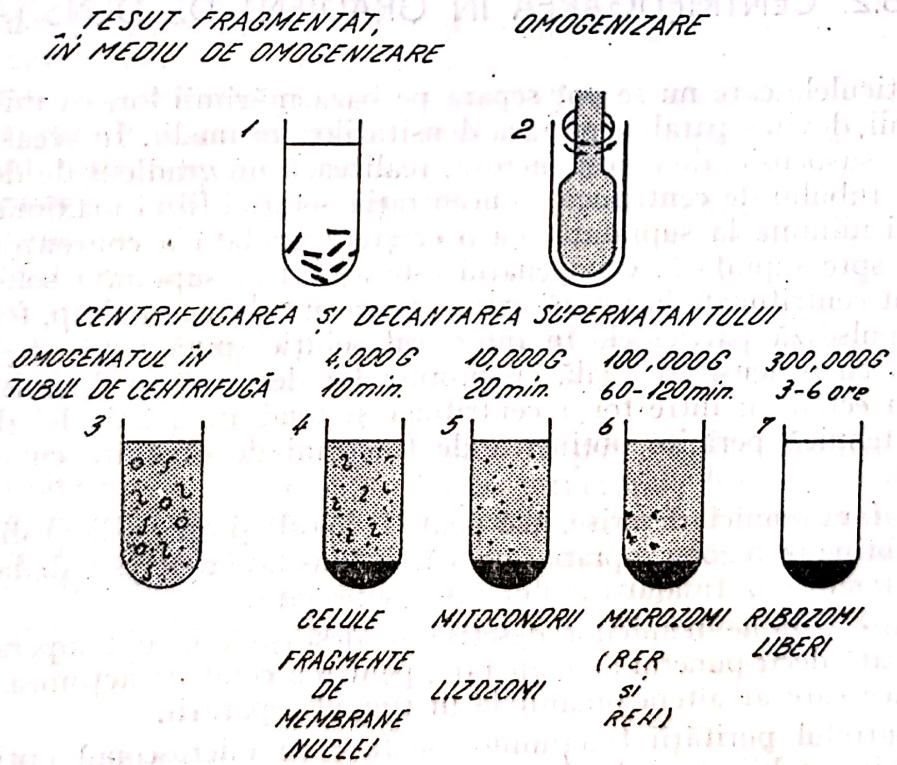


Fig. 1.2. — Fracționarea celulară prin centrifugare diferențială.

fiecare cu o mărime, formă și densitate medie caracteristice. Așezînd acest preparat la suprafața unui mediu de suspensie, ca sucroza, și supunîndu-l la o forță gravitațională crescîndă prin centrifugare, particulele constitutive

pot fi separate în funcție de mărimea și densitatea lor. Centrifugarea diferențială le fracționează în primul rînd pe baza mărimii lor, în timp ce centrifugarea în gradient de densitate, pe baza densității lor medii.

1.8.1. CENTRIFUGAREA DIFERENȚIALĂ

În această metodă de fracționare componentele celulare sînt centrifugate într-un mediu cu densitate mică, pînă cînd cele mai mari particule încep să sedimenteze și formează un „bănuț" la fundul tubului (v. fig. 1.2.). Odată ce o fracțiune a sedimentat (ceea ce se determină prin încercări și corectarea erorilor), lichidul rămas — supernatantul — poate fi transferat în al doilea tub și centrifugat pe o durată mai lungă, la viteză mai mare, pentru a se depune o nouă fracțiune. Procesul se repetă, și, în practică, dintr-un țesut se pot obține succesiv: o fracțiune formată din celule întregi și membrană plasmatică, o fracțiune nucleară, o fracțiune „mitocondrială", o fracțiune microzomală, o fracțiune „solubilă" care nu mai sedimentează. Fracțiunea „mitocondrială" conține nu numai mitocondrii ci și lizozomi și alte organite de mărime similară. Fracțiunea microzomală derivă în cea mai mare parte din reticulul endoplasmic.

1.8.2. CENTRIFUGAREA ÎN GRADIENT DE DENSITATE

Particulele care nu se pot separa pe baza mărimii lor, ca mitocondriile și lizozomii, devin separabile pe baza densităților lor medii. În această metodă mediul de suspensie, de obicei sucroza, realizează un gradient de densitate în interiorul tubului de centrifugă, concentrația soluției fiind maximă la fundul tubului și minimă la suprafață, cu o creștere gradată a concentrației de la adîncime spre suprafață. Omogenatul este așezat la suprafața soluției și tuburile sînt centrifugate la viteză mare, cîteva ore. În acest timp, forța centrifugă propulsează particulele în interiorul soluției pînă cînd acestea ajung în stratul cu o densitate egală cu propria lor densitate medie, nivel la care există un echilibru între forța centrifugă și tendința particulei de a flota. Această tehnică permite obținerea de fracțiuni de organite cu o puritate avansată.

În afara tehnicii descrise, mai poate fi folosit și un gradient discontinuu, care se obține prin zone suprapuse, a căror densitate descrește de la o zonă la alta începînd de la fundul tubului către suprafață.

Toate stadiile tehnicilor descrise se desfășoră la o temperatură ușor mai ridicată decît punctul de înghețare, pentru a combate acțiunea sistemelor enzimatice care ar altera organitele în timpul separării.

Controlul purității fracțiunilor se face cu microscopul optic (pentru nuclei, mitocondrii, granule de secreție), cu microscopul electronic (ribozomi, microzomi) sau cu metode chimice. De exemplu, fracțiunea ce conține lizozomii poate fi identificată prin cantitatea de fosfatază acidă, enzima *marker* pentru aceștia, iar fracțiunea conținînd nucleii, prin cantitatea de ADN prezentă în ea.

Scanned with OKEN Scanner

Izolarea componentelor celulare prin centrifugare reprezintă o mare realizare tehnică, întrucît permite studiul detaliat al componentelor celulare, care se pot obține în stare relativ pură ca: nucleul, nucleolul, mitocondriile, RER, REN, ribozomii, granulele de secreție, granulele de pigment.

Principiile de bază ale separării prin centrifugare pot fi folosite pentru separarea celulelor, de exemplu separarea hematiilor de leucocite, ca și pentru separarea componentelor moleculare și macromoleculare ale celulelor, ca de exemplu, subunitățile ribozomale și acizii nucleici corespunzători. În condiții standard, rata sedimentării fiecărei componente este suficient de previzibilă pentru a fi folosită pentru clasificarea macromoleculei respective; astfel, particula sau molecula are un *coeficient de sedimentare sau valoarea „S"*, măsurată în unități Svedberg, valoare care depinde de forma, mărimea, densitatea particulei și de vîscozitatea mediului. De exemplu, ribozomii liberi au un coeficient de sedimentare 80 S, iar ARNt — un coeficient de sedimentare 4 S.

1.9. MICROSCOPIE

1.9.1. MICROSCOPIE OPTICĂ

Microscopul, folosit de obicei în laboratorul de histologie, este numit microscop optic sau microscop cu lumină vizibilă ori microscop cu cîmp luminos. Este descendentul direct al microscopului folosit în secolul al XIX-lea, care a inaugurat era cercetării histologice.

În principiu, microscopul optic constă dintr-un *condensator*, care focalizează pe preparat raze luminoase emise de un *bec*, un suport pe care stă preparatul, numit *platina* microscopului, un *sistem de lentile-obiectiv* și un *sistem de lentile-ocular* (fig. 1.3). Preparatul trebuie să fie suficient de subțire, și anume de ordinul micrometrilor, pentru ca lumina să-l poată străbate. O parte din lumină este absorbită la trecerea prin preparat, dar în mod diferit de către diferitele părți ale preparatului, ceea ce produce contraste care evidențiază detaliile structurale. Deoarece sistemul optic al microscopului nu dă un contrast suficient în preparatul necolorat, contrastul este mărit prin colorarea țesutului.

Utilitatea microscopului optic rezidă în puterea sa măritoare și mai ales în capacitatea de a diferenția detalii structurale fine, datorită puterii de rezoluție. *Puterea de rezoluție* este capacitatea unei lentile sau a unui sistem optic de a produce imagini separate ale unor elemente aflate la distanță foarte mică. Ea se definește deci prin distanța minimă dintre două puncte ale preparatului, care pot fi văzute distinct în imagine, conform formulei lui Abbe:

$$d = \frac{\lambda}{AN}$$

unde d = distanța dintre două puncte ale preparatului văzute distinct în imagine;

λ = lungimea de undă a radiației folosite (lumină vizibilă);

AN = apertura numerică a sistemului optic (pentru detalii vezi p. 60).

Scanned with OKEN Scanner

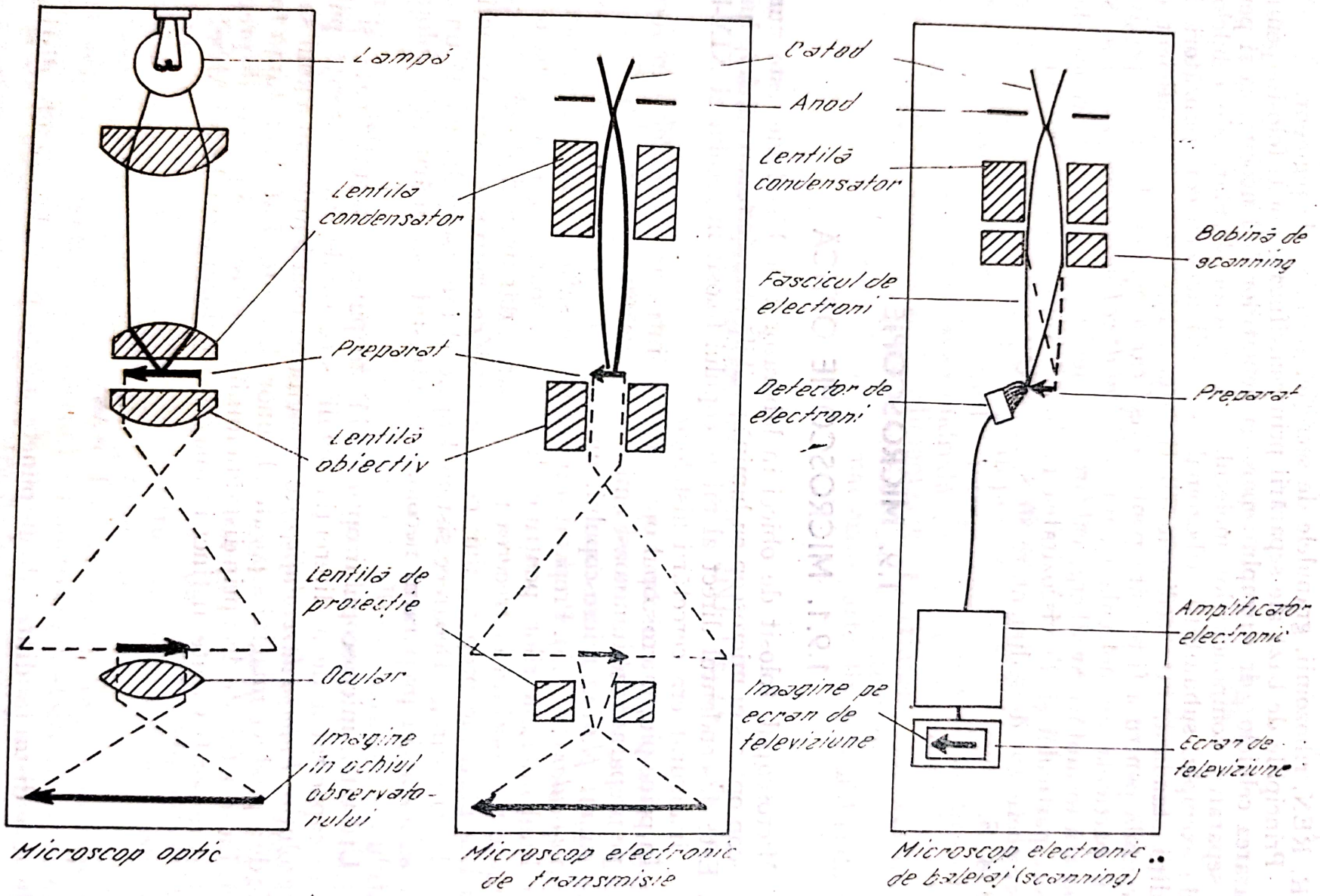


Fig. 1.3. — Schema formării imaginii în microscopul optic și în microscopul electronic.

Scanned with OKEN Scanner

Gradul de rezoluție depinde nu numai de sistemul optic și de lungimea de undă a luminii emisă de sursă, ci și de alți factori cum ar fi grosimea preparatului. Cu o lumină a cărei lungime de undă este de 540 nm (tabelul 1.V), filtrată printr-un filtru verde, la care ochiul este foarte sensibil, cu un obiectiv și un condensator corespunzătoare, cu o grosime a preparatului optimă, cea mai mare putere de rezoluție ce poate fi atinsă de un microscop optic este de 0,2 μm. Ocularul mărește imaginea produsă de obiectiv, dar nu crește rezoluția*.

1.9.1.1. Microscopul cu contrast de fază

Microscopul cu contrast de fază dă posibilitatea de a examina celule și țesuturi necolorate, fapt deosebit de util pentru examinarea celulelor *vii*. Există diferențe mici între indicii de refracție ai diverselor părți ale celulei și ale părților componente ale țesuturilor. Lumina ce trece prin zone cu indice mai mare de refracție este deviată și defazată față de fasciculul principal de unde luminoase. Asemenea diferențe, produse de refracție, nu sînt evidente la microscopul optic obișnuit. La microscopul cu contrast de fază undele luminoase defazate interferă cu alte unde defazate induse, ceea ce le diminuează amplitudinea inițială. În esență, undele luminoase întîrziate inițial de către componente specifice ale țesutului, sînt apoi micșorate ca amplitudine cu ajutorul unui set de inele din sistemul optic, creîndu-se astfel un contrast suficient. Microscopul cu contrast de fază este folosit nu numai pentru examinarea celulelor și țesuturilor vii, ci și a secțiunilor groase, necolorate, de masă plastică.

Din microscopul cu contrast de fază au derivat două instrumente, și anume: *microscopul cu interferență*, care permite aprecierea cantitativă a masei unor componente tisulare, și *microscopul cu interferență diferențială*, util pentru a evalua proprietățile suprafeței celulelor și ale altor structuri biologice.

1.9.1.2. Microscopul de fluorescență

Microscopul de fluorescență detectează molecule fluorescente, adică emițătoare de lumină cu lungime de undă în domeniul vizibil, după ce au fost expuse la lumină ultravioletă emisă de o sursă. Este folosit pentru a evidenția molecule cu fluorescență naturală (autofluorescență), ca vitamina A și catecolaminele, dar de vreme ce moleculele autofluorescente nu sînt numeroase, cea mai răspîndită aplicație a sa este evidențierea fluorescenței induse ca în detectarea reacției antigen-anticorp, în metodele imunochimice (vezi fig. 1.1).

Molecule specific fluorescente pot fi injectate unui animal sau direct în celule și folosite ca trasoare. Asemenea metode au fost folosite la studiul joncțiunilor intercelulare de tip *gap*, la precizarea traiectului căilor nervoase în neurobiologie, la detectarea *marker*-ilor fluorescenți ai creșterii în țesuturile mineralizate.

---

* Mărirea (produsul dintre mărirea dată de obiectiv și cea dată de ocular) maximă utilă este de cca 1 400 ×.

Scanned with OKEN Scanner

1.9.1.3. Microscopul cu ultraviolete

Microscopul cu ultraviolete folosește o sursă de lumină ultravioletă; principiul de funcționare se bazează pe absorbția luminii ultraviolete de către moleculele preparatului. Microscopia în ultraviolet este asemănătoare spectrofotometriei dar rezultatele sînt înregistrate fotografic. Preparatul nu poate fi observat printr-un ocular, căci ultravioletele nu sînt vizibile și lezează ochiul. Metoda folosește la detectarea acizilor nucleici, în mod specific a bazelor purinice și pirimidinice ale nucleotidelor, ca și la detectarea proteinelor care conțin anumiți aminoacizi.

1.9.1.4. Microscopul cu lumină polarizată

Microscopul cu lumină polarizată prezintă unele mici modificări față de microscopul optic obișnuit. Lumina polarizată trece prin preparat, iar un alt polarizor este folosit pentru a rota planul luminii polarizate, cu scopul de a detecta orientarea unei specii de molecule dintr-un țesut. Substanțele cristaline și moleculele bine ordonate ce formează fibre, schimbă planul luminii polarizate care le străbate, schimbare detectată de un sistem de lentile. Rotația planului luminii polarizate, datorată orientării moleculelor din componentele tisulare, este o proprietate numită *birefringență* (planșele 7—8).

TABELUL 1.V

Unități de măsură folosite în microscopie

1 milimetru (mm) = 10^{-3} m = 1 000 micrometri
1 micrometru (μm) = 10^{-6} m = 1 000 nanometri
1 nanometru (nm) = 10^{-9} m = 10 Angströmi
1 Angström (Å) = 10^{-10} m = 0,1 nanometri

1.9.2. MICROSCOPIE ELECTRONICĂ

Există două tipuri de microscoape electronice: microscopul electronic de transmisie și microscopul electronic de *scanning* (baleiaj).

1.9.2.1. Microscopul electronic de transmisie (TEM *)

Microscopul electronic de transmisie (TEM*) folosește un fascicul de electroni, în loc de lumină, pentru a produce imaginea. Componentele esențiale ale unui microscop electronic de transmisie sînt (vezi fig. 1.3): 1) *catodul*, un filament de tungsten încălzit, care constituie sursa de electroni; 2) *anodul*, care creează o diferență de potențial între catod și anod de la 60 000 la 100 000 volți (aceasta deplasează electronii în tubul microscopului); 3) un sistem de electromagneți, care servesc drept lentile-condensator, lentile-obiectiv și lentile de proiecție (magneții creează cîmpuri electromagnetice care deviază

* TEM = *Transmission Electron Microscope* (engl.).

Scanned with OKEN Scanner

și focalizează fasciculul de electroni); 4) un suport pentru preparat (pe el se așază o grilă metalică fină, pe care stă secțiunea de țesut inclusă în masă plastică, prin care trec electronii; 5) un ecran pe care apare imaginea; 6) un dispozitiv unde imaginea poate fi prinsă pe un film fotografic.

Secțiunile subțiri pentru TEM se prepară după aceleași principii ca și pentru microscopul optic. Există totuși diferențe, legate de folosirea electronilor ca agent al imaginii. Electronii trec prin preparat, apoi cad pe un film fotografic sau pe un ecran pentru vederea directă. Formarea imaginii în miscroscopul electronic se bazează pe faptul că unii electroni nu pot trece prin preparat, ci sînt deviați de substanțele cu masă mare prezente în mod natural în preparat sau adăugate preparatului în timpul fixării și contrastării. Din cauza puterii de rezoluție mari (d = 2 Å *) a microscopului electronic, este necesar să se folosească fixatori care să conserve cît se poate de bine structurile. Acești fixatori reușesc să rețină în preparat substanțe care, de obicei, se pierd în cursul preparării țesutului pentru microscopul optic. Procedeele de fixare curente folosesc *glutaraldehida* pentru a păstra constituenții de natură proteinică ai celulei și *tetraoxidul de osmiu* pentru a păstra componentele lipidice, mai ales fosfolipidele. Deoarece conține un metal greu, tetraoxidul de osmiu joacă un rol major în deflexia electronilor și, în consecință, în formarea imaginii. În loc de parafină, țesutul este inclus în masă plastică; fiind mai dură, permite obținerea unor secțiuni mult mai fine, cu o grosime de ordinul nanometrilor. Microtoame speciale, cu cuțite de diamant, se folosesc în acest scop. Secțiunile se așază pe o grilă din plasă de cupru, apoi se contrastează. Substanțele contrastante conțin metale grele (exemple: acetat de uranil, citrat de plumb). Spre deosebire de metoda pentru microscopul optic, în care parafina trebuie îndepărtată înainte de colorare, preparatul inclus în plastic nu necesită îndepărtarea mediului de includere. Grila pe care stă secțiunea contrastată se plasează în microscop, iar porțiunea din preparat din dreptul ochiurilor grilei poate fi văzută pe ecran sau fotografiată.

În funcție de densitatea lor, structurile cu densitate mare, care împrăștie electronii, apar de culoare neagră și sînt numite dense la fluxul de electroni, iar cele cu densitate mică, deci care lasă electronii să treacă nedeviați, sînt numite clare la fluxul de electroni. Între aceste două extreme există o gamă foarte bogată de structuri cu diferite densități, care dau nuanțe diferite de gri.

O metodă specială de preparare a eșantioanelor pentru TEM este *procedeul înghețare-fracturare*. Țesutul de examinat poate fi fixat sau nu. Dacă a fost fixat, fixatorul se îndepărtează din preparat prin spălare. Țesutul este îmbibat cu o substanță crioprotectoare, ca glicerina, apoi înghețat rapid la —90°. Formarea cristalelor de gheață este prevenită prin folosirea crioprotectorilor, rapiditatea înghețării și folosirea unor fragmente de țesut extrem de mici. Țesutul înghețat este plasat în aparatul de fracturare, într-o cameră unde este menținut în vid. Țesutul este fracturat cu ajutorul unui instrument tăios, atașat unui braț mecanic mobil; de fapt nu este tăiat, ci fracturat de-a lungul unui plan corespunzător planului dispozitivului tăios. Fisurile apar de preferință de-a lungul planului hidrofob al membranelor, paralel sau aproape paralel cu planul de fractură, expunînd astfel fețele interne ale celor două

* Puterea de rezoluție ideală (folosind o secțiune cu grosime ideală) a TEM este de 2 Angströmi, dar în practică, deoarece finețea secțiunilor este limitată de condițiile tehnice, se atinge o rezoluție de 1,2 nm.

Scanned with OKEN Scanner

straturi lipidice ale plasmalemei. Țesutul fracturat rămîne pentru scurt timp în camera cu vid, în decursul căruia apa înghețată se evaporă, făcînd ca unele detalii structurale să capete relief mai accentuat. Apoi preparatul este îmbrăcat în platină, pentru a crea un mulaj complementar. Cu alte cuvinte, platina devine o replică a suprafeței de fractură. Țesutul este îndepărtat, iar replica metalică se așază pe grilă și este examinată la TEM. O asemenea replică poate evidenția detalii la nivel molecular (fig. 1.4).

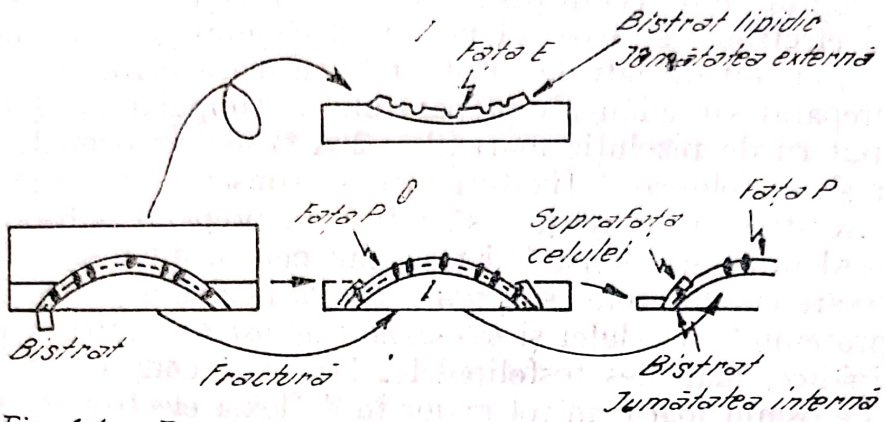


Fig. 1.4. — Procedeul înghețare-fracturare. Un preparat înghețat este fracturat în vid la — 160°. Întîi se vaporizează metalul sub un unghi ascuțit pe suprafața expusă pentru a realiza o replică a suprafeței. Apoi se realizează contrastul, vaporizînd carbon la 90° deasupra metalului. Replica metalică umbrită se examinează la microscopul electronic. Fractura clivează membrana celulară de-a lungul planului median al bistratului lipidic. Fețele astfel expuse se numesc fața P și fața E. Suprafața reală a membranei poate fi văzută numai spărgînd stratul de gheață înainte de metalizare și umbrire.

1.9.2.2. Microscopul electronic de *scanning* (SEM*)

Microscopia electronică de *scanning* diferă de TEM prin aceea că electronii nu trec prin preparat pentru a forma imaginea, ci un fascicul de electroni mătură suprafața preparatului. Electronii reflectați de această suprafață sînt colectați de un detector și prelucrați astfel încît să poată fi proiectați pe un ecran de televiziune, unde vor da o imagine tridimensională. SEM, cu o rezoluție de aproximativ 100 Å, permite o gamă variată de măriri. Se folosește o mare varietate de metode pentru obținerea preparatelor pentru SEM. În vederea examinării țesuturilor mineralizate, țesuturile moi sînt îndepărtate cu ajutorul unui oxidant, apoi se examinează structura materialului. Pentru examinarea țesuturilor moi, țesutul este fixat, deshidratat (prin înghețare și desicare în vid), acoperit cu un film (din aur sau carbon), montat pe un portobiect, apoi examinat la SEM.

Analiza razelor X emise de preparat în microscopul electronic. Cînd fasciculul de electroni al TEM sau SEM bombardează preparatul, se produc radiații X cu lungimi de undă caracteristice elementelor lovite de electroni. SEM și TEM pot fi echipate cu detectori care captează razele X și cu analizori adecvați pentru identificarea elementelor care le-au emis. Folosind

* SEM = *Scanning Electron Microscope* (engl.).

Scanned with OKEN Scanner

accesorii adecvate, TEM și SEM devin instrumente analitice care pot detecta prezența elementelor cu numărul atomic mai mare de 12 și pot face și estimări cantitative foarte exacte.

1.9.2.3. Microscopul electronic de înalt voltaj

Microscopul electronic de înalt voltaj, instrument mai puternic decît microscopul electronic obișnuit, este un microscop electronic de transmisie, cu un tub accelerator de dimensiuni mari (lungimea totală — 10 m), în care este posibilă accelerarea electronilor de 10 ori mai mult decît în microscopul electronic obișnuit, la o diferență de potențial de cca un milion de volți. Acest voltaj dă electronilor suficientă energie cinetică pentru a pătrunde prin preparate secționate la cîțiva micrometri, sau chiar prin celula intactă. Imaginea ce rezultă este o „radioscopie" cu electroni, ce evidențiază structura internă a celulei, fără să fie nevoie de secționarea ei fină, sub 2 μm, așa cum se procedează pentru microscopul electronic obișnuit.

Principalul avantaj al microscopiei electronice de înalt voltaj este acela că „vede în profunzime", dînd o imagine a organizării tridimensionale a celulei. Rezoluția și adîncimea cîmpului sînt excelente pe toată grosimea preparatului. Folosirea acestui instrument a permis vizualizarea arhitecturii celulare interne și a unor detalii de structură, care, datorită finețiii lor extreme și extinderii în spațiul întregii celule, nu puteau fi evidențiate pe secțiuni prea subțiri. Astfel, se fac progrese în elucidarea structurii fine a matricei citoplasmatice. Cercetările se efectuează asupra elementelor citoscheletale, ca și a formelor de existență mai puțin bine definite ale complexelor macromoleculare proteice, descrise de unii autori ca rețea microtrabeculară. Alții, fără să nege posibilitatea organizării morfologice ordonate a complexelor macromoleculare, contestă existența rețelei microtrabeculare considerînd-o un artefact (vezi matricea citoplasmatică). Făcînd abstracție de faptul că preparatul microscopic dă o imagine diferită de situația din organismul viu, prin însuși actul preparării, examinarea la microscopul electronic de înalt voltaj pune probleme deosebite de tehnică, pentru obținerea unor preparate în care structurile să fie pe cît posibil mai puțin distorsionate. În acest scop se folosesc diferite procedee. Unul dintre acestea se aplică la examinarea celulelor crescute în culturi. Ele sînt cultivate direct pe o grilă fină, acoperită cu un film de masă plastică, apoi fixate cu glutaraldehidă, contrastate cu tetraoxid de osmiu, deshidratate în alcool sau acetonă. Acestea sînt îndepărtate prin transferarea preparatului în bioxid de carbon lichid; în final preparatele sînt fixate prin metoda punctului critic. Se evită astfel distorsiunile datorate tensiunii superficiale, care face ca celulele să se retracte cînd sînt uscate lent, la aer. În cazul uscării lente există concomitent în preparat bioxid de carbon în starea lichidă și în cea gazoasă, iar la interfețele gaz-lichid tensiunea superficială mare produce deformarea structurilor. Metoda punctului critic constă din creșterea bruscă a temperaturii peste punctul critic, ceea ce duce la trecerea instantanee a bioxidului de carbon din starea lichidă în cea gazoasă. Grilele sînt apoi păstrate într-un desicator ce conține pentaoxid de fosfor și pot fi examinate la microscop. Îndepărtarea incompletă a apei, alcoolului sau bioxidului de carbon din preparat, duce la modificarea accentuată a structurilor.

Scanned with OKEN Scanner

1.9.3. FOLOSIREA CORECTĂ A MICROSCOPULUI OPTIC

Această scurtă îndrumare pentru folosirea corectă a microscopului optic este destinată acelor studenți care vor folosi microscopul optic la examinarea de rutină a țesuturilor.

Precizările ce urmează, deși par elementare, sînt necesare pentru că foarte des cei ce folosesc microscopul nu știu să-i exploateze eficient posibilitățile. În ciuda faptului că în prezent dispunem de instrumente foarte perfecționate, există puțină instrucție formativă cu privire la folosirea microscopului optic. Instrumentele optice își pot da performanța maximă numai atunci cînd fasciculele de lumină — acela ce servește la iluminarea preparatului și acela ce contribuie la crearea imaginii — sînt corect centrate. Utilizarea traiectoriei optime a fasciculelor luminoase va contribui substanțial la recunoașterea detaliilor fine ale preparatului și la evidențierea exactă a culorilor în imaginea observată sau fotografiată. Cheia microscopiei corecte este iluminarea Kohler. Principiile ei sînt încorporate în construcția tuturor microscoapelor optice moderne. Redăm în continuare cîteva instrucțiuni practice pentru a obține o iluminare corectă în microscop:

— se așază preparatul în axul optic al microscopului;

— se închide diafragma cîmpului;

— se focalizează condensatorul mișcîndu-l în sus și în jos pînă cînd conturul diafragmei cîmpului apare net;

— se centrează diafragma cîmpului pe condensator, apoi se deschide pînă cînd cîmpul luminos acoperă tot cîmpul de observat;

— se scoate ocularul și se observă deschiderea din afară a obiectivului. Se vede un cîmp iluminat circular, a cărui rază e direct proporțională cu apertura numerică a obiectivului. Dacă se închide diafragma condensatorului, conturul ei va apărea în acest cîmp circular. Pentru majoritatea preparatelor colorate se fixează diafragma condensatorului așa încît să acopere aproximativ 2/3 din apertura obiectivului. Astfel se obține proporția optimă între rezoluție și contrast.

Numai 5 operații simple și imaginea obținută va fi cît de bună permite optica microscopului. Să vedem acum de ce.

Întîi, de ce ajustăm diafragma cîmpului, ca să acopere numai cîmpul observat ? Pentru că iluminarea unui cîmp mai mare decît poate „vedea" sistemul optic duce la reflectarea luminii în preparat și la crearea de fascicule luminoase aberante, deci la scăderea contrastului.

De ce se reglează diafragma condensatorului, adică apertura iluminării ? Această diafragmă influențează mult rezoluția și contrastul. În practică, rezoluția e determinată de

$$d = \frac{\lambda}{AN_{obiectiv} + AN_{condensator}}$$

unde:

d = distanța între două puncte ale preparatului care sînt văzute distinct în imagine, în nanometri;

λ = lungimea de undă a lungimii folosite (verde 540 nm);

AN = apertura numerică, adică sinusul jumătății unghiului (2α) sub care obiectivul (sau condensatorul) „privește" punctul central al cîmpului

Scanned with OKEN Scanner

observat din preparat, înmulțit cu indicele de refracție n al mediului dintre obiectiv (condensator) și preparat. AN = n sin α.

Cum influențează lungimea de undă și apertura numerică, direct, rezoluția? Structurile din preparat difractă lumină. Unghiul de difracție este direct proporțional cu λ și invers proporțional cu distanța dintre structuri. După Ernst Abbe, o distanță dată între două puncte poate fi „rezolvată" numai dacă sistemul optic (obiectivul) poate „vedea" o parte din lumina produsă prin difracție în acest spațiu. Cu cît apertura obiectivului este mai mare, cu atît o cantitate mai mare din lumina de difracție participă la formarea imaginii, rezultînd rezoluția detaliilor mai mici și imagini mai contrastate. Formula arată că apertura condensatorului este la fel de importantă ca și cea a obiectivului. Afirmația apare desigur logică dacă examinăm unghiul de difracție al unei raze oblice, datorată aperturii mari a condensatorului. Acest unghi rămîne constant, dar este prezentat obiectivului astfel încît intră în cîmpul vizual al acestuia (fig. 1.5).

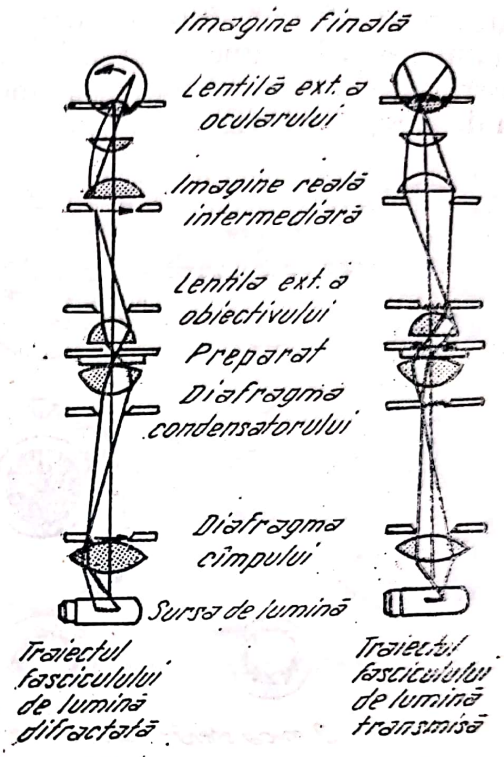


Fig. 1.5. — Iluminarea în microscopul optic. Schemă.

Cum influențează potrivirea aperturii contrastul (adică diferența de intensitate între ariile luminoase și întunecate din preparat)? Transferul cel mai fidel al contrastului de la preparat la imagine se obține teoretic prin interferența între fronturile de undă nedifractate și cele difractate. Pentru transferul contrastului între transmisia completă a luminii și absorbția ei completă de către preparat, relația intensităților luminii difractate și, respectiv nedifractate, trebuie să fie 1 : 1; se obține astfel o interferență complet distructivă (negru) sau o interferență complet constructivă (luminozitate). Cînd apertura condensatorului este aceeași cu apertura obiectivului, lumina nedifractată intră în obiectiv cu intensitate maximă, dar numai o parte din lumina difractată poate intra, rezultînd un contrast slab. Închiderea aperturii condensatorului la 2/3 din cea a obiectivului, aduce raportul între intensitatea luminii difractate și cea a luminii nedifractate aproape de 1 : 1 și astfel se obține un contrast optim. Închizînd prea mult apertura condensatorului sau coborînd prea mult condensatorul se vor produce fenomene de interferență sau inele de difracție care dezorganizează imaginea. Multe tehnici microscopice folosite pentru mărirea contrastului, ca iluminarea oblică, cîmpul întunecat, contrastul de fază se bazează pe același principiu, adică suprimă sau reduc intensitatea luminii nedifractate, pentru a îmbunătăți contrastul. Respectînd precauțiile de mai sus și menținînd curățenia lentilelor, calitatea și fidelitatea imaginilor vor depinde numai de performanța intrinsecă a sistemului optic.

Scanned with OKEN Scanner

1.10. INTERPRETAREA TRIDIMENSIONALĂ A IMAGINILOR MICROSCOPICE. STEREOLOGIE ȘI MORFOMETRIE

Secțiunile de țesuturi preparate pentru microscopul optic sau microscopul electronic, ne oferă o imagine bidimensională a structurilor. Interpretarea unei singure secțiuni poate induce în eroare cu privire la forma reală, tridimensională a unei structuri. În acest sens exemplul cel mai familiar este interpretarea care se poate da unor secțiuni, în diferite incidențe, printr-un ou de găină fiert (fig. 1.6). Exemplul ales este similar cu situația unor secțiuni

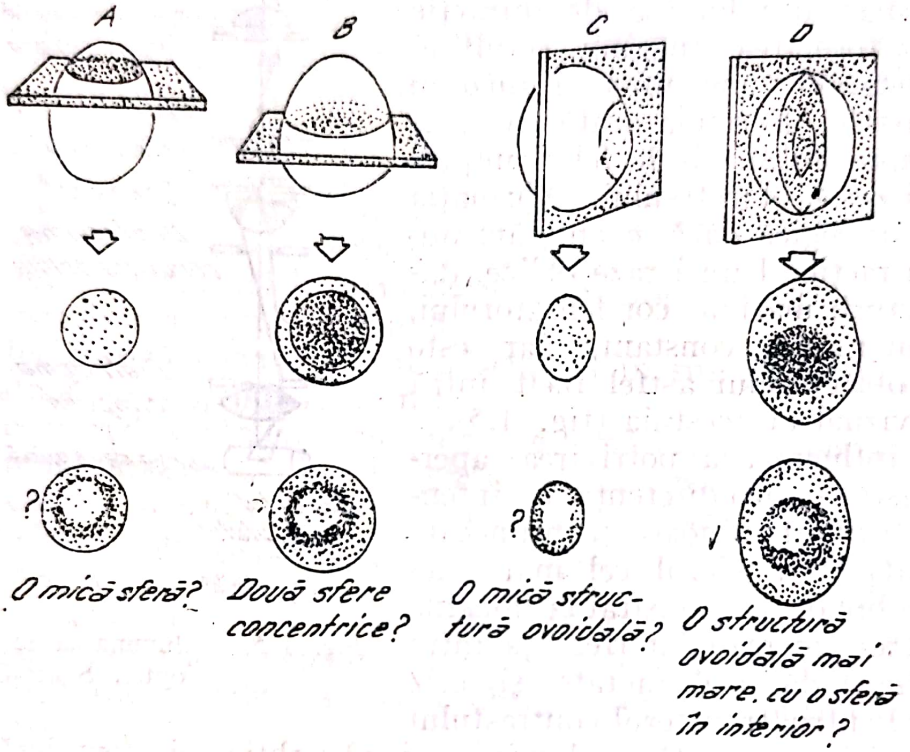


Fig. 1.6. — Secțiuni în diferite incidențe printr-un ou de găină fiert.

în diferite incidențe printr-o celulă. Astfel, la microscopul optic celule cu dimensiuni egale, de același tip, pot apărea de mărimi și forme diferite, din cauză că secțiunea le interceptează în incidențe diferite. Dacă secțiunea nu trece prin nucleu, se creează impresia falsă că celula este anucleată. Prin suprapunerea unor stucturi aflate în planuri diferite, observate prin transparența preparatului, acestea pot fi greșit localizate. De pildă, nucleul excentric al unor celule (adipocit, fibră musculară striată), situat imediat sub plasmalemă, poate părea că are o poziție centrală, deoarece privit frontal prin transparența preparatului, el se proiectează în plină masă citoplasmatică.

Aceleași probleme de interpretare tridimensională se pun și în cazul arhitecturii interne a organelor. Majoritatea organelor glandulare sînt înconjurate de o capsulă din care pleacă septuri conjunctive ce subdivid glanda în compartimente (lobi și lobuli). Deși ele au formă și mărime comparabile, vor apărea diferite, în funcție de incidența secțiunii. Acest fapt se poate intui făcînd comparația cu secțiuni ale unei portocale tăiată în diferite planuri (fig. 1.7).

Scanned with OKEN Scanner

Organele tubulare ca: vasele sanguine, vasele limfatice, ductele excretorii, tubul digestiv etc. sînt cel mai ușor de recunoscut în secțiune transversală. Atunci cînd sînt secționate longitudinal, oblic sau tangențial, sau atunci cînd secțiunea intercepteaza curburile lor, ele trebuie reconstituite în cele trei dimensiuni, pentru a fi recunoscută forma tubulară (fig. 1.8).

În toate cazurile este posibil să se obțină serii lungi de secțiuni adiacente, consecutive, numite secțiuni seriate. Reconstituirea cît mai exactă a arhitecturii tridimensionale este posibilă numai prin interpretarea unui număr adecvat de secțiuni seriate, în cele trei planuri. Secțiunile seriate pot fi fotografiate și mărite proporțional, încît să se obțină prin asamblarea lor un model mărit la scară. Acest procedeu este numit *reconstrucție* și a fost mult folosit mai ales în histologia embriologică.

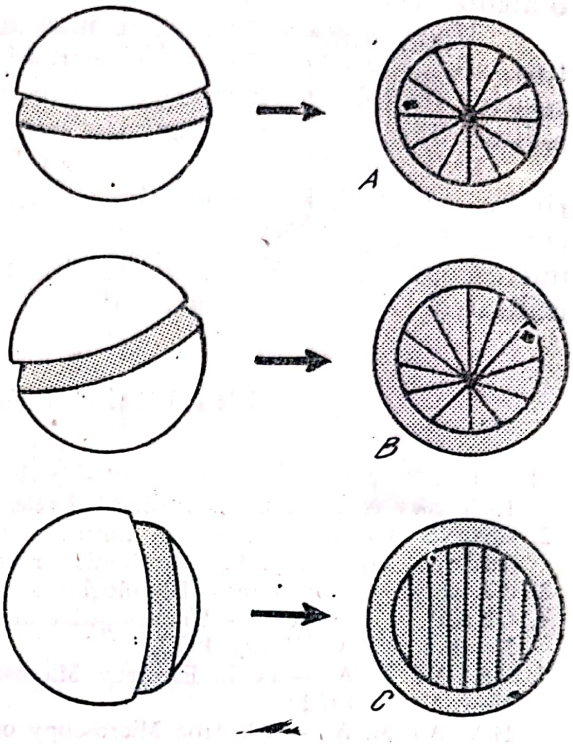


Fig. 1.7. — Secțiuni în diferite incidențe printr-o portocală.

Interpretarea tridimensională implică și alte procedee, mai abstracte, ce țin seama de considerente geometrice, pe baza cărora sînt analizate nu numai mărimea și forma, ci se pot face și determinări cantitative.

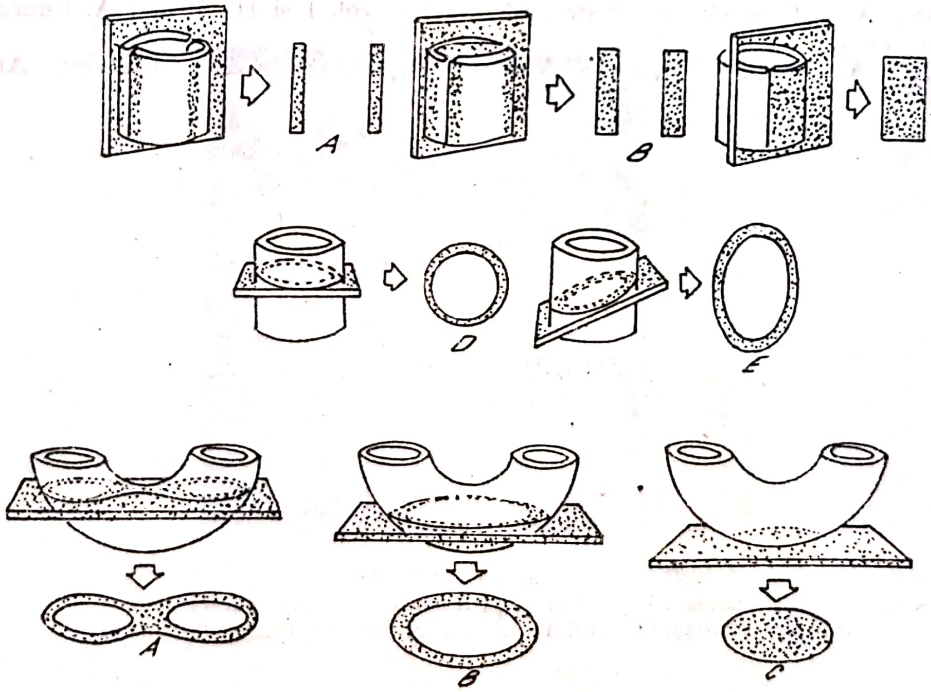


Fig. 1.8. — Secțiuni în diferite incidențe prin formațiuni tubulare.

Scanned with OKEN Scanner

Stereologia este știința care măsoară și reconstruiește structura tridimensională, în urma examinării secțiunilor bidimensionale, ceea ce implică o analiză geometrică a structurilor.

Morfometria se ocupă cu măsurarea mărimii relative a diferitelor structuri, adică cu exprimarea în termeni cantitativi a suprafețelor și volumelor relative. Datele morfometrice se pot obține prin multe procedee de măsurare a dimensiunilor, inclusiv prin determinări stereologice.

Există instrumente care vizualizează direct suprafața și volumul diferitelor structuri într-o manieră tridimensională, cum sînt, în domeniul microscopiei optice, microscopul cu interferență diferențială, iar în domeniul microscopiei electronice, microscopul de *scanning*, dar aceasta nu exclude utilitatea metodelor menționate.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ALLFREY V. — The isolation of subcellular components. In : "The Cell" (sub red. Brachet J., Mirsky A.E.), vol. I, Academic Press, New York, 1960.
2. COONS A. H. — Fluorescent antibody methods. In: „General Cytochemical Methods" (sub red. Danielli J. F.), Academic Press, New York, 1958.
3. GABE M. — Techniques Histologiques, Masson et Cie, Paris, 1968.
4. GRAY P. (sub red.) — Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique, Van Nostrand Reinhold, New York, 1973.
5. HAYAT M. A. — Basic Electron Microscopy Techniques, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1972.
6. HAYAT M. A. — Electron Microscopy of Enzymes, vol. I, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1973.
7. HAYAT M. A. — Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy, University Park Press, Baltimore, 1978.
8. KOWDRY E. V. — Laboratory Techniques, ed. a III-a, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1962.
9. PARKER R. C. — Methods of Tissue Culture, ed. a III-a, Hoeber, 1961.
10. PEARSE A. G. E. — Histochemistry, ed. a III-a, vol. I și II, J. and A. Churchill Ltd., Londra, 1973.
11. ROGERS A. W. — Techniques of Autoradiography, ed. a II-a, Elsevier, Amsterdam, 1973.

Scanned with OKEN Scanner

Planșa 1. — Microfotografia unei secțiuni de intestin uman: colorație hematoxilină-eozină; nucleii apar colorați în albastru-violet; citoplasma bazofilă a celulelor glandelor intestinale — violet; citoplasma celulelor musculare și colagenul — roz; globulele roșii — roșu-strălucitor.

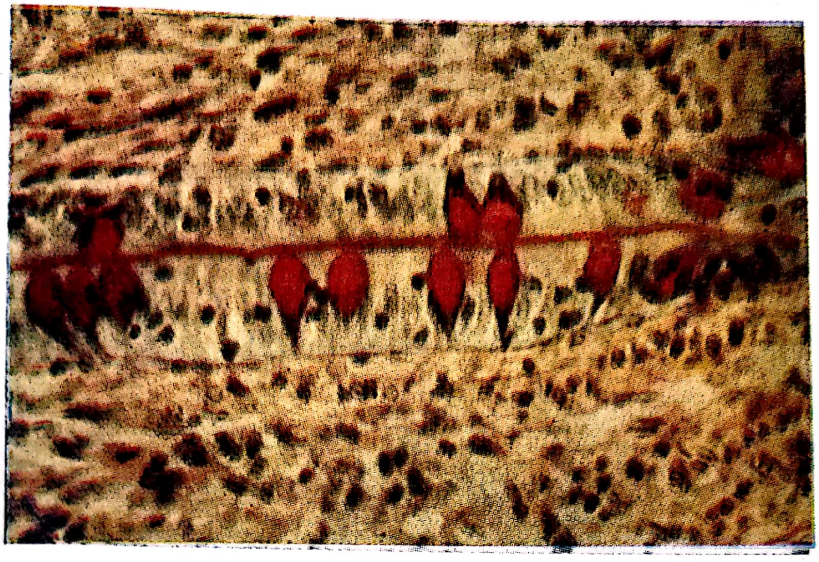
Planșa 2. — Aceeași secțiune ca în fig. 1: colorație tricromă Mallory: nucleii apar colorați în albastru-violet; citoplasma — de la roz la violet; colagenul — albastru.

Scanned with OKEN Scanner

Planșa 3. — Aceeași secțiune ca în fig. 1: colorație hematoxilină și Van Gieson; nucleii apar colorați în negru-brun; citoplasma — galben ca paiul; colagenul — roșu strălucitor

Planșa 4. — Microfotografia unei secțiuni prin ficat: colorație hematoxilină-carmin Best; nucleii apar colorați în albastru-violet; granulele de glicogen — roșu-strălucitor.

Scanned with OKEN Scanner

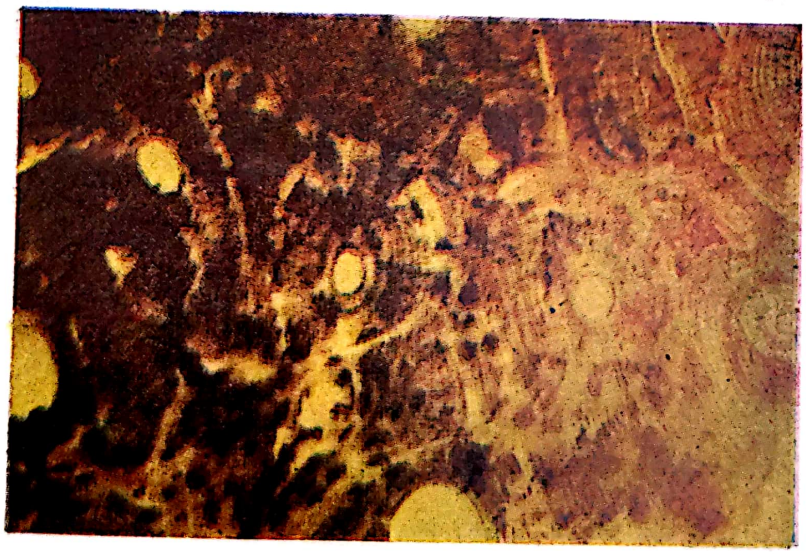


Planșa 5. — Microfotografia unei secțiuni prin corticala renală: colorație PAS; membranele bazale sînt roșu-violet-strălucitor.

Planșa 6. — Microfotografia unei secțiuni cu vilozitățile intestinale: colorație hematoxilină — PAS. Nucleii sînt negru-brun; membrana bazală, mucusul din celulele caliciforme și de la suprafața epiteliului — roșu-violet-strălucitor.

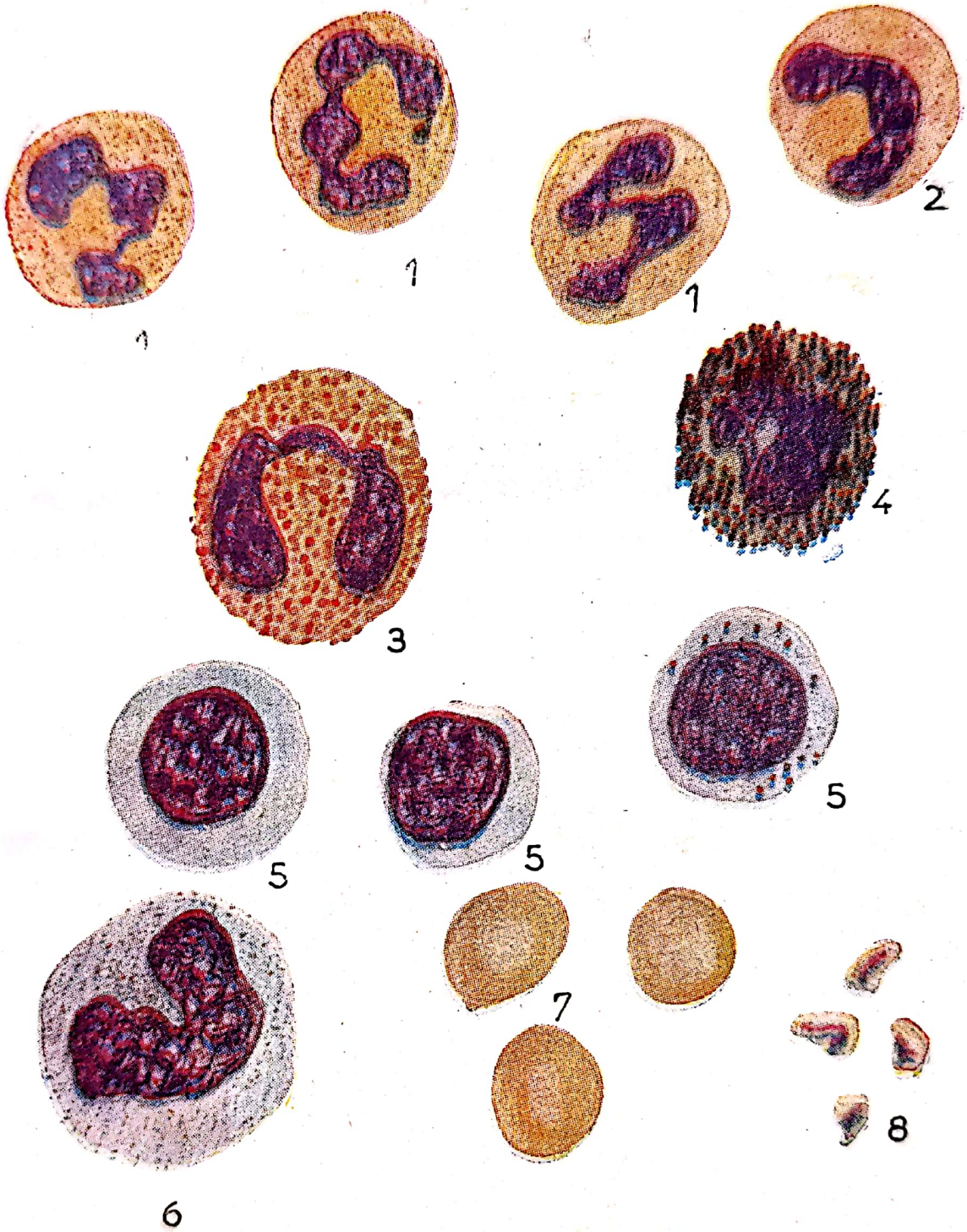
Scanned with OKEN Scanner

Planșa 7. — Secțiune transversală prin os compact nedecalcifiat. Microfotografie la microscopul de polarizație cu nicolii încrucișați. Canalele Havers dau imaginea crucii de Malta datorită dispoziției perpendiculare una pe alta a fibrelor de colagen din lamelele osoase adiacente ce compun peretele osteonului; fibrele de colagen în secțiune longitudinală se disting datorită striațiilor lor transversale.



Planșa 8. — Aceeași secțiune ca în planșa 7. Microfotografie în lumină nepolarizată.

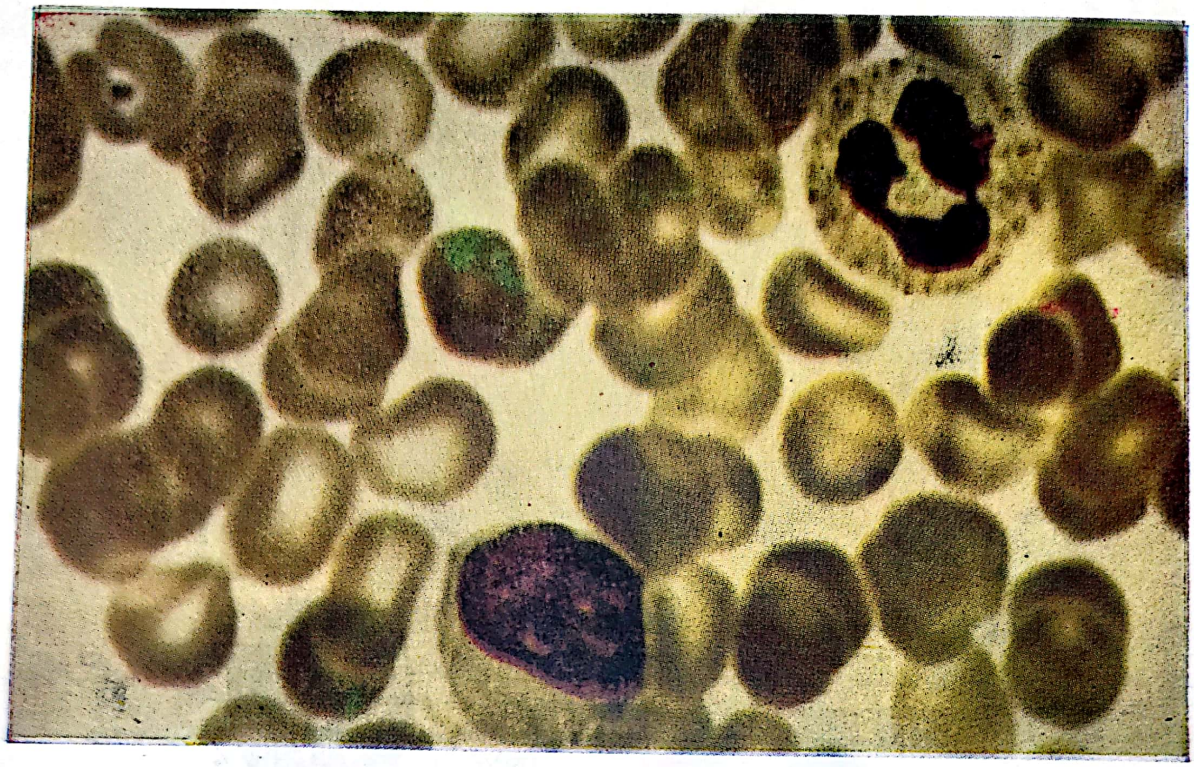
Scanned with OKEN Scanner



Planșa 7. 1. — Reprezentare schematică a elementelor figurate în sîngele periferic:

1 — neutrofil segmentat; *2* — neutrofil nesegmentat; *3* — eozinofil; *4* — bazofil; *5* — limfocite; *6* — monocit; *7* — eritrocite; *8* — — reticulocite.

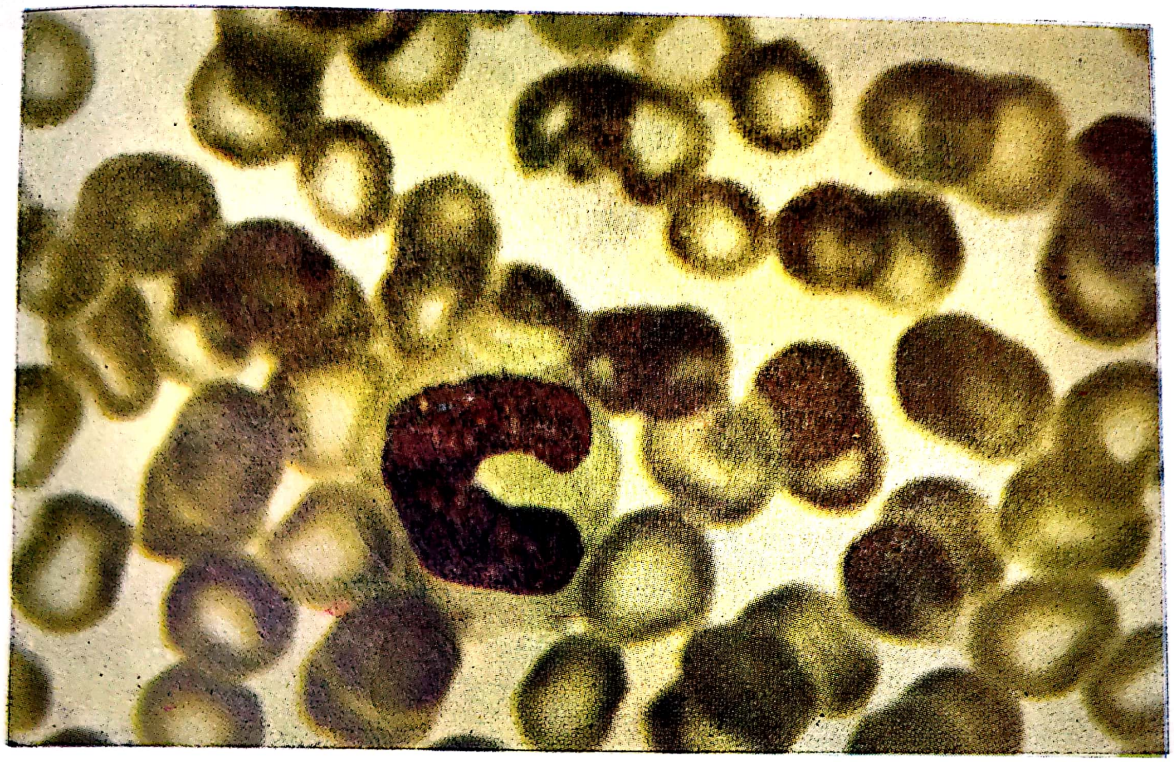
Scanned with OKEN Scanner



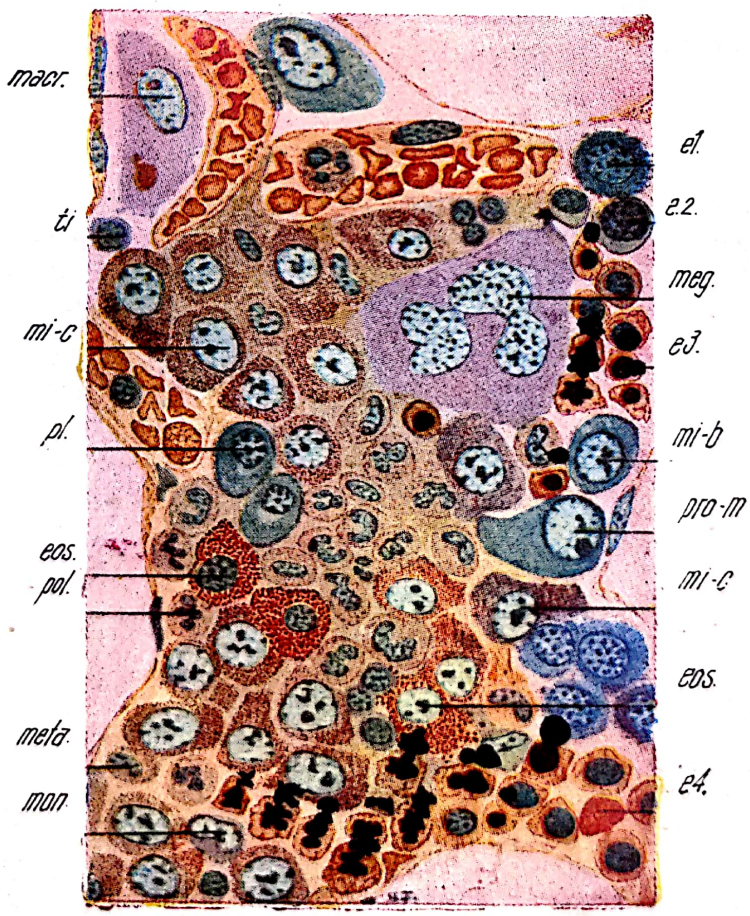
Planșa 7. 2. — Neutrofil, limfocit, eritrocite în sîngele periferic.

Planșa 7. 3. — Bazofil și eritrocite în sîngele periferic.

Scanned with OKEN Scanner



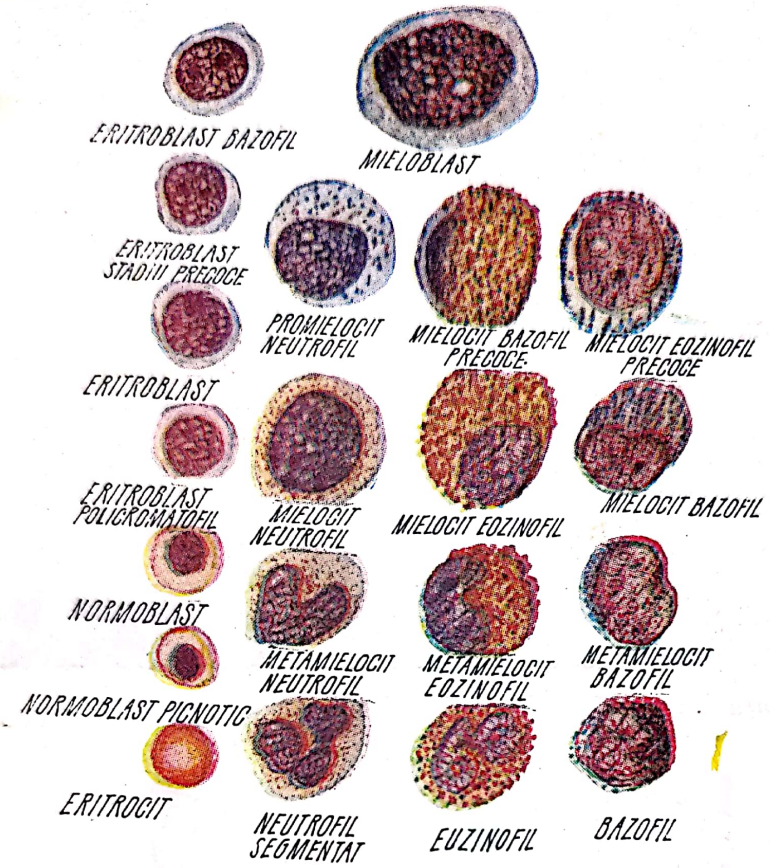
Planșa 7. 4. — Monocit și eritrocite în sîngele periferic.



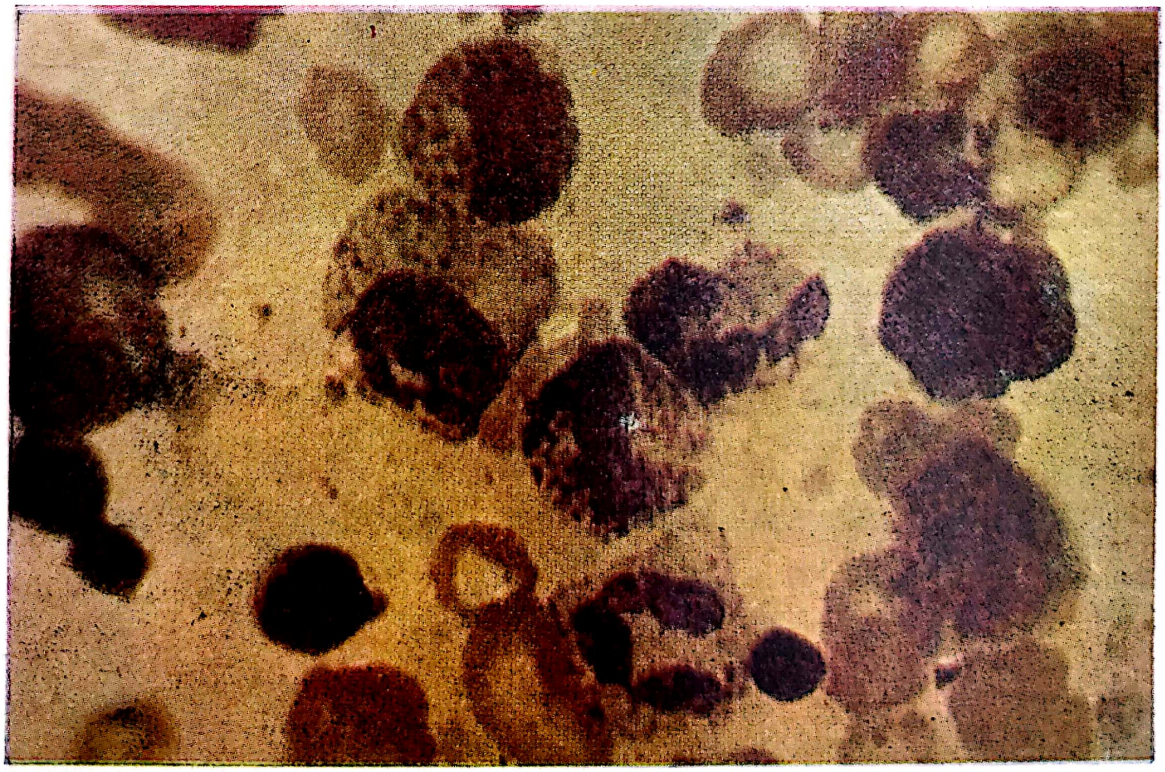
Planșa 7. 5. — Măduva hematogenă:

eos — eozinofil; *li* — limfocit; *macr* — macrofag; *meg* — megacariocit; *meta* — metamielocit; *mon* — monocit; *mi-b* — mieloblast; *pro-m* — promielocit; *mi-c* — mielocit; *pl* — plasmocit; *pol* — polimorfonuclear; *el*, *e2*, *33*, *e4* — stadii de maturare a eritroblastului (fixare Zenker, colorare Zenker, colorare floxină-albastru de metilen, × 900).

Scanned with OKEN Scanner

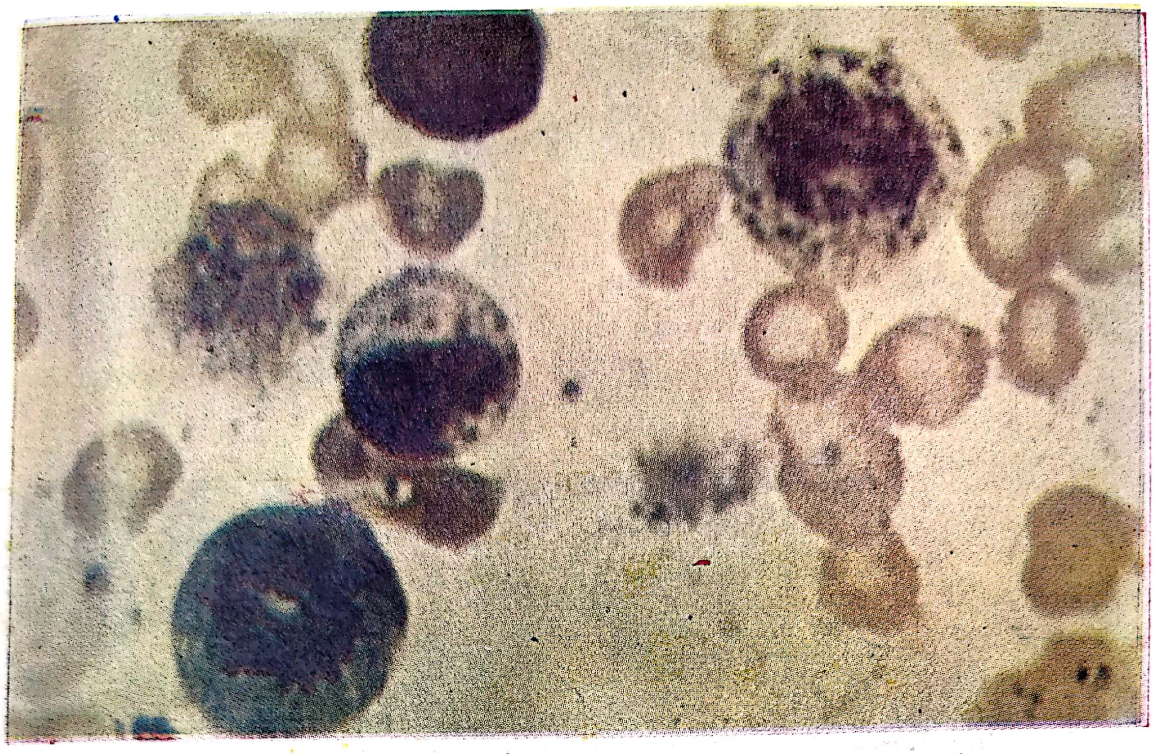


Planșa 7. 6. — Hemopoieza.

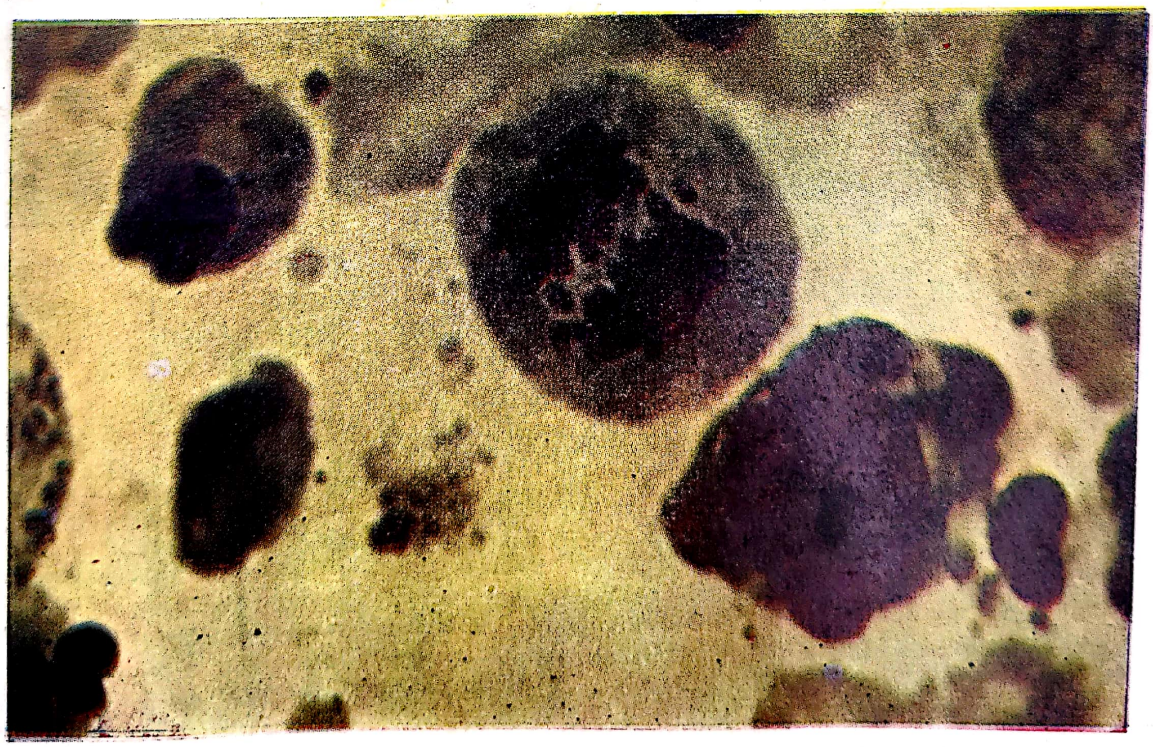


***Planșa** 7. 7.* — Hematopoieza: precursori granulocitari, eritrocitari și limfocitari.

Scanned with OKEN Scanner

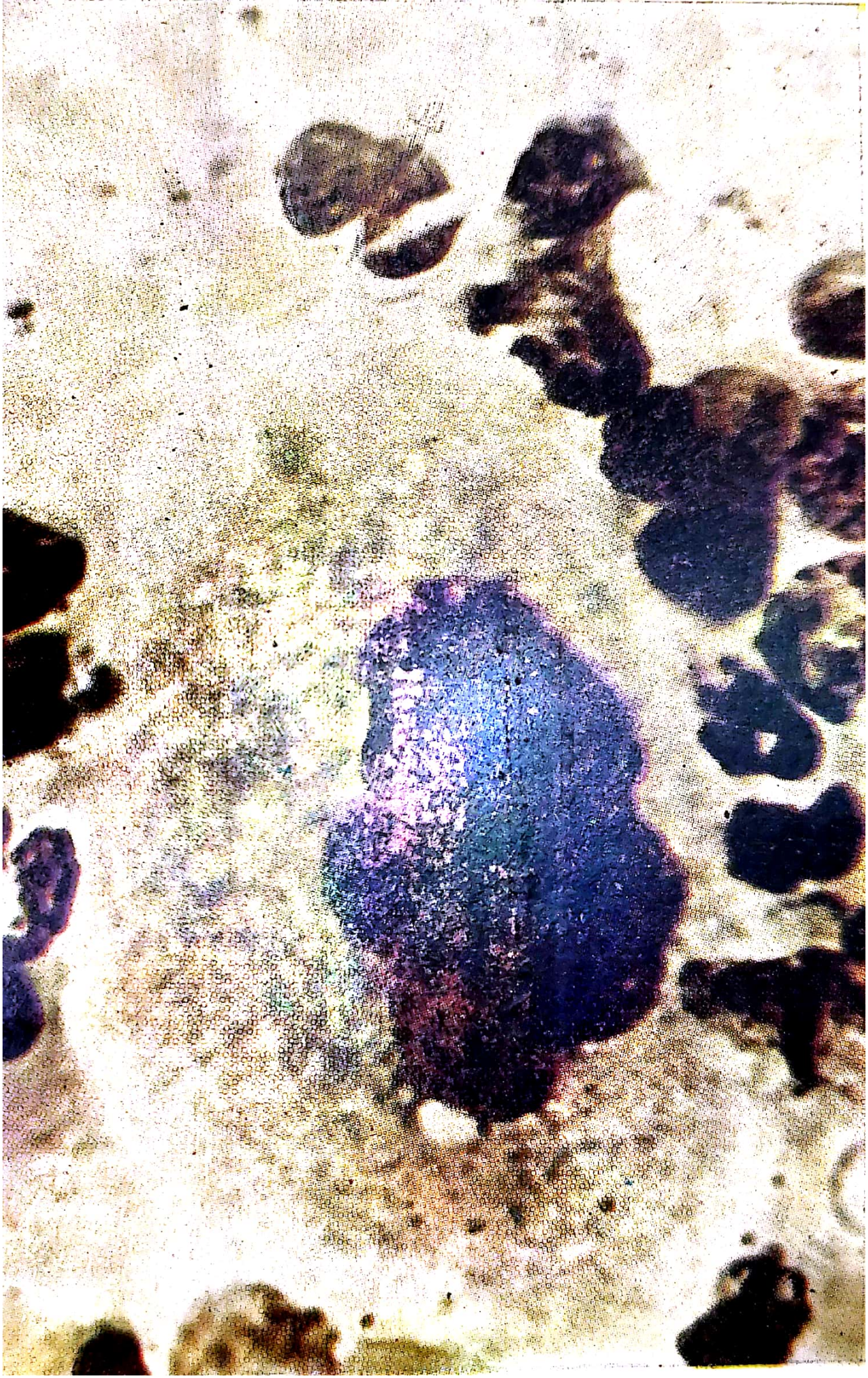


Planșa 7. 8. — Hematopoieza: precursori granulocitari, mitoză.



Planșa 7. 9. — Hematopoieza: precursori granulocitari, anafaza mitotică.

Scanned with OKEN Scanner



Scanned with OKEN Scanner

CELULA

2.1. LOCUL CELULEI ÎN LUMEA VIE

2.1.1. CELULA ÎN IERARHIA STRUCTURILOR BIOLOGICE

Celula este unitatea elementară a lumii vii, produs al evoluției, cu o structură complexă, aflată într-o relație de autonomie și echilibru dinamic cu mediul înconjurător, principalele ei proprietăți fiind creșterea, dezvoltarea și autoreproducerea.

Organizarea biologică poate fi privită ca o ierarhie de niveluri structurale progresiv mai complexe, care începe cu simple molecule ce edifică ansambluri moleculare, structuri subcelulare și trece printr-un punct nodal — celula — ce stă la baza alcătuirii țesuturilor, organelor, sistemelor și organismelor. În interiorul acestei ierarhii celula este primul nivel la care apare cea mai importantă caracteristică a materiei vii — capacitatea de autoreproducere. Formele de „viață moleculară", identificate pînă acum, prionii * și virusurile **, pot fi considerate vii numai în măsura în care sînt capabile să interacționeze cu celulele, de care depind pentru a se reproduce.

Întreaga organizare a celulei poate fi explicată în lumina tendinței ei dominante — autoreproducerea. Componentul central al oricărei celule este genomul*** care conține codificată în structura sa informația genetică, adică programul tuturor evenimentelor vitale din celulă. Pentru a se reproduce, celula trebuie să își replice genomul, să transcrie și să traducă informația codificată în el, încît să genereze moleculele și macromoleculele necesare edificării structurilor sale. Aceste operații cer o alimentare continuă cu ener-

* Prioni = microorganisme formate din particule proteice, agenți patogeni ai unor „infecții lente". Constituie o enigmă biologică, deoarece fără să conțină acizi nucleici, se reproduc în interiorul celulelor printr-un mecanism încă necunoscut.

** Virusuri = microorganisme ce conțin un acid nucleic și proteine. Se reproduc în interiorul celulelor, „impunînd" celulei programul lor genetic.

*** Genom = totalitatea genelor (determinanții eredității) dintr-o celulă, organism, specie. Informația conținută în genom diferă de la specie la specie, dar este comună tuturor celulelor aceleiași specii.

Scanned with OKEN Scanner

gie metabolică și un mediu înconjurător bine controlat. Componente subcelulare specializate îndeplinesc aceste operațiuni și satisfac aceste cerințe.

2.1.2. UNITATEA MATERIEI VII

Toate speciile ce trăiesc astăzi sînt celule sau ansambluri ordonate de celule.

Biochimia a stabilit principiul general al unității materiei vii la nivel molecular. Toate ființele vii folosesc aceiași aminoacizi, aceleași nucleotide, aceleași lipide și monozaharide, pentru a-și construi macromoleculele specifice și a-și satisface nevoile metabolice. Căile lor metabolice urmează aceleași etape sau implică alternative ce duc la produși similari.

Unitatea materiei vii se extinde și la nivelul celular. Există două arhetipuri * celulare, și anume prokariotele și eukariotele.

S-a arătat că organizarea fundamentală a tuturor celulelor ce aparțin fiecărui arhetip este aceeași, indiferent de taxonomia celulei sau de gradul ei de diferențiere, toate celulele posedînd același fel de construcții macromoleculare și componente subcelulare.

2.1.3. ARHETIPURILE CELULARE

Bacteriile și algele albastre-verzi sînt prokariote.

Protozoarele și celulele metazoarelor, ca și plantele uni- și pluricelulare sînt eukariote.

Celulele eukariote ** sînt mult mai mari decît prokariotele și au în general un sistem complicat de membrane intracelulare care delimitează un set caracteristic de compartimente intracelulare. Unul din aceste compartimente — nucleul — este reședința genomului, care este astfel separat clar de restul celulei, reprezentat de citoplasmă.

În prokariote *** membranele intracelulare practic lipsesc, astfel că genomul nu este separat de citoplasmă prin membrane. Ele nu au deci nucleu distinct.

În medicină, prokariotele sînt studiate în primul rînd ca agenți patogeni (bacteriile). În acest capitol vor fi descrise eukariotele, și anume celulele eukariote ce compun organismul uman.

Organismul uman constă dintr-un mare număr de celule (10^{12}—10^{15}), care aparțin multor tipuri celulare (aproximativ 1 000), fiecare diferențiată astfel încît să îndeplinească o funcție specifică cu maximum de eficiență. Fiecare din aceste tipuri celulare este rezultatul expresiei preferențiale a acelor gene (din genomul comun tuturor celulelor speciei) care sînt în legătură cu funcția sa specializată. Dată fiind unitatea de organizare menționată, nu apare deloc surprinzător faptul că celulele umane sînt foarte asemănătoare cu celulele altor mamifere și vertebrate. Deosebirile între tipurile diferite de

---

* Arhetip (gr. *arkhetupos*) = model primitiv. Introducerea noțiunii în contextul biologiei celulare îi aparține lui G. E. Palade.

** Eukariot = bine nucleat.

*** Prokariot = prenucleat.

Scanned with OKEN Scanner

celule diferențiate ale aceleiași specii sînt relativ mari și ușor de recunoscut. În schimb, deosebirile între celulele diferențiate de același tip, aparținînd unor specii diferite, sînt foarte mici.

2.2. ORGANIZAREA GENERALĂ A CELULEI EUKARIOTE

2.2.1. MĂRIME ȘI FORMĂ

Deși sînt de aproximativ 1 000 de ori mai mari decît prokariotele, celulele eukariote au dimensiuni sub limita de rezoluție a ochiului uman, adică sub 0,1 mm. În imensa lor majoritate diametrul lor este cuprins între 10 și 30 μm. Acest fapt explică de ce cercetarea în biologia celulară și histologie depinde de instrumentele măritoare. Există totuși cîteva excepții notabile: ovocitul uman are diametrul de aproximativ 200 μm; dimensiunile corpului multor celule nervoase se apropie de 100 μm; mai mult, unele celule nervoase posedă prelungiri cu un diametru de ordinul micrometrilor, dar cu lungimi de centrimetri sau metri ! În mod similar, fibra musculară striată, de forma unui cilindru, are un diametru de ordinul micrometrilor și lungimea de centimetri, raportul între lungime și diametru fiind de ordinul 10^3—10^5.

Printre cele mai mici celule din organism se numără limfocitele mici (diametru ~6 μm) și celulele granulare din cortexul cerebelos (~ 3—4 μm).

Forma celulelor variază cu localizarea și tipul lor (fig. 2.1). În general, sînt prismatice atunci cînd sînt așezate în grupuri sau straturi compacte, sferice cînd

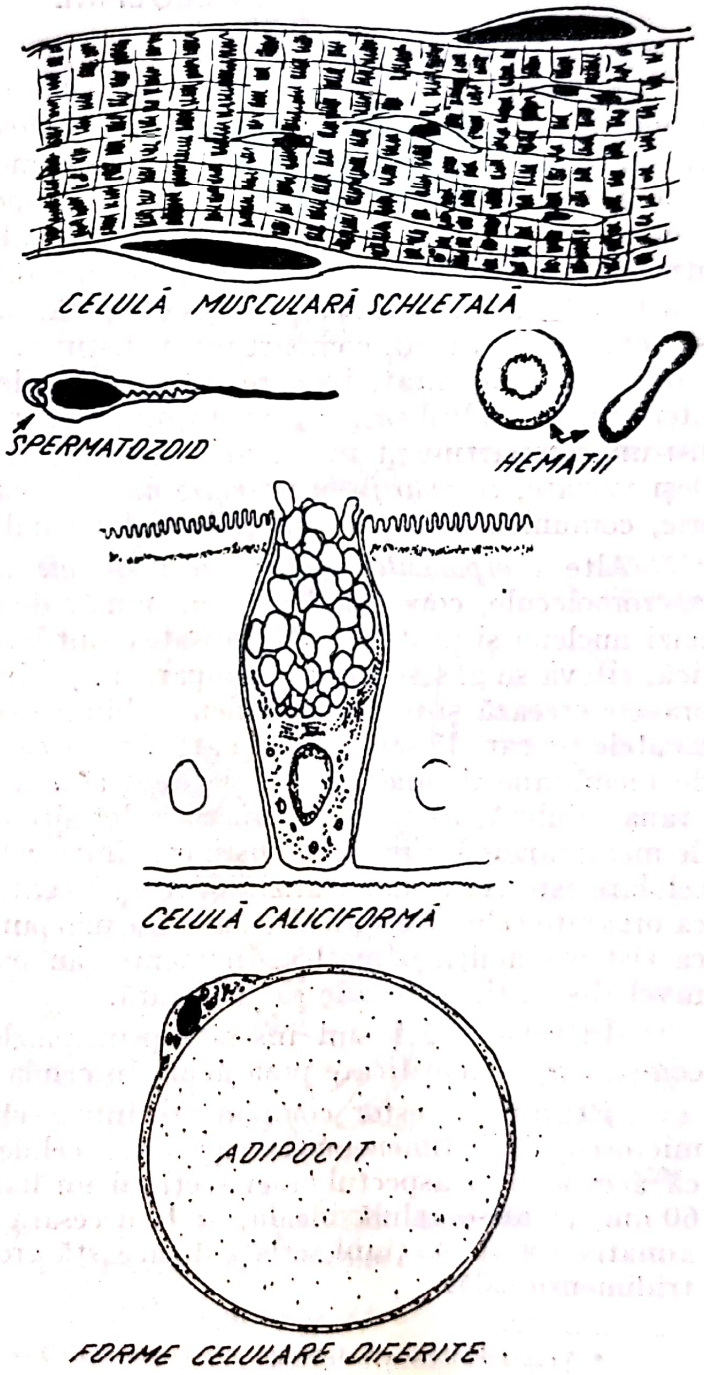


Fig. 2.1.—Forme celulare diferite.

se află libere într-un mediu fluid, alungite sau fuziforme cînd aderă la un substrat solid.

Interdependența dintre formă și funcție este pregnantă în cazul hematiei, care își menține activ forma de disc biconcav, ce oferă suprafața maximă pentru un volum dat. Îndeplinirea funcțiilor celulare specializate implică uneori schimbarea permanentă a formei celulei, cum se întîmplă, de exemplu, în cazul leucocitelor, sau a dimensiunilor celulei, în cazul fibrei musculare.

2.2.2. COMPARTIMENTAREA CELULEI ȘI ORGANITELE CELULARE

Celula eukariotă are o membrană celulară, care o delimitează de mediul înconjurător, și un sistem de membrane intracelulare care pot avea suprafața sau masa de 10—20 de ori mai mare decît membrana celulară. Structura de bază a tuturor membranelor este aceeași, modelul acestei structuri constituindu-l membrana „unit" *. Totuși, la eukariotele animale, membranele intracelulare pot fi împărțite în 10 tipuri diferite, pe următoarele criterii: structura caracteristică, compoziția chimică, funcția. Fiecare tip de membrană este organizat ca un compartiment distinct. Rezultatul final este un sistem înalt compartimentat, în care o varietate de compartimente mai mici (ce diferă unul de altul prin natura membranei și prin conținutul lor) sînt incluse într-un compartiment mai mare, continuu, numit matricea citoplasmatică. Deși variate, *compartimentele mărginite de endomembrane*, cu o matrice proprie, comunică între ele, interrelația lor fiind riguros controlată.

Alte *componente celulare, nedelimitate de membrane*, sînt asocieri de macromolecule, copolimeri ai unui număr de molecule diferite (proteine sau acizi nucleici și proteine). Majoritatea sînt localizate în matricea citoplasmatică, cîteva se găsesc în alte compartimente intracelulare. De vreme ce membranele creează și mențin gradiente chimice și electrochimice între compartimentele pe care le separă, se poate afirma că structurile celulare nedelimitate de membrane depind ca funcție de gradientele menținute primar de membrana celulară, în timp ce funcția celorlalte cere gradiente speciale, produse de membranele lor proprii. Distincția între cele două categorii de componente celulare este clară, dar tranziția între agregatele macromoleculare identificate ca organite celulare, spre alte agregate mai puțin structurate, descrise de obicei ca sisteme multienzimatice, filamente sau particule, este gradată. La acest nivel distincția este adesea arbitrară.

În tabelul 2.I sînt inserate principalele compartimente subcelulare și componente identificate pînă acum în celula eukariotă.

Reunirea acestor componente într-o schemă oferă imaginea electronomicroscopică bidimensională tipizată a celulei eukariote (fig. 2.2). Admițînd că acesta ar fi aspectul unei secțiuni mediane cu grosimea de aproximativ 60 nm, printr-o celulă ideală, ar fi necesară informația culeasă de pe aproximativ 350 de secțiuni seriate de această grosime, pentru a construi o celulă tridimensională.

* Vezi membrana celulară.

Deși destul de diferite ca organizare, componentele celulei au o trăsătură comună pregnantă, și anume fiecare din ele este construită pentru a îndeplini o funcție care îi este proprie. De aceea, prin analogie, ele sînt privite ca mici organe (organite) specializate ale celulei. Membrana celulară transportă diferite substanțe în ambele sensuri, înăuntrul sau în afara celulei, recepționează mesajele externe, conferă identitate celulei. Nucleul este centrul coordonator al celulei, unde au loc replicarea și transcripția informației genetice, iar în citoplasmă are loc traducerea mesajului genetic, prin

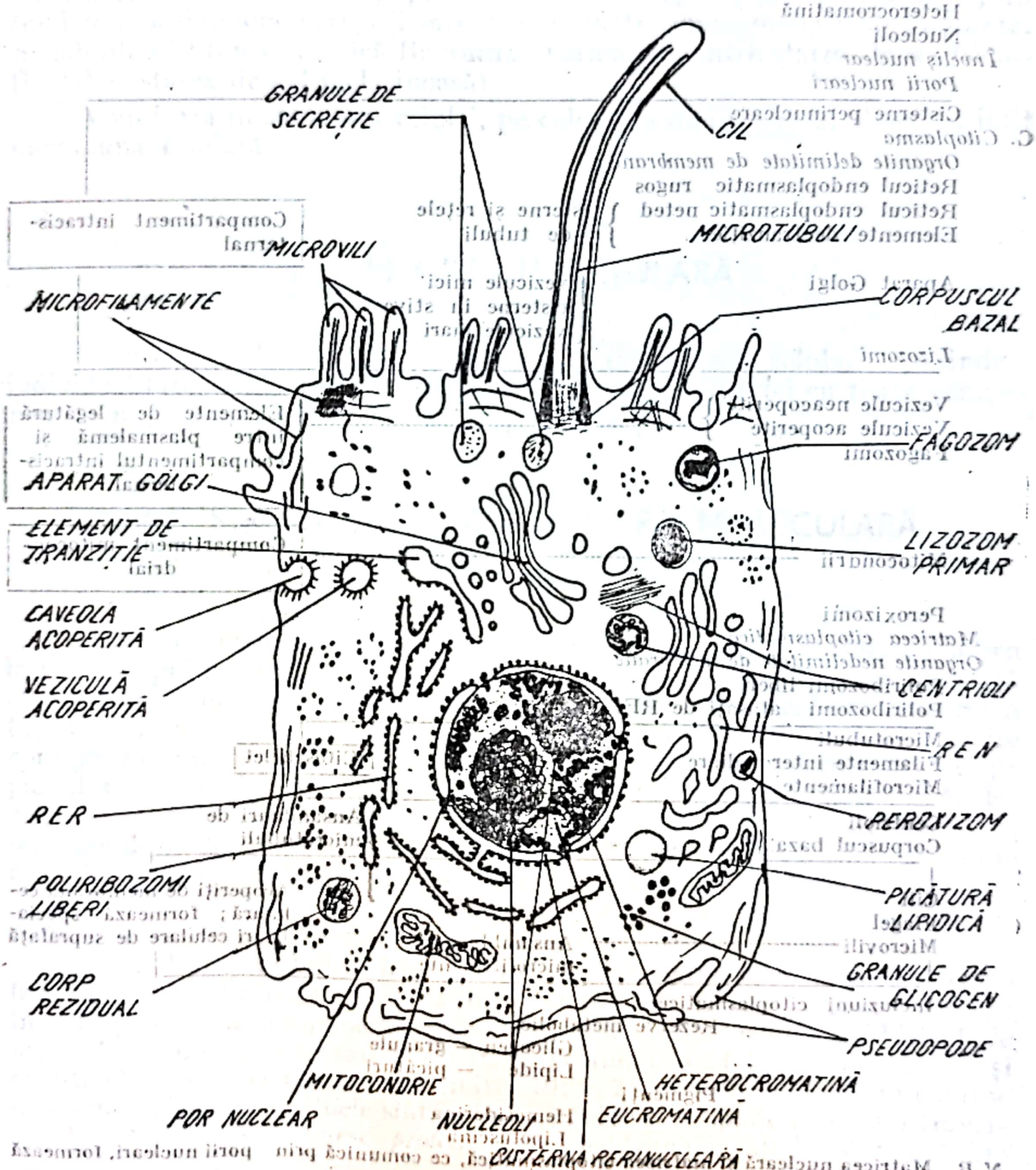


Fig. 2.2. — Celulă eucariotă ideală.

Principalele componente ale celulei eucariote

A. *Membrana celulară*
- Pseudopode
- Caveole acoperite
- Invaginări

B. *Nucleul*
- *Nucleoplasma*
  - Matrice nucleară
  - Eucromatină
  - Heterocromatină
  - Nucleoli
- *Înveliș nuclear*
  - *Porii nucleari*
  - Cisterne perinucleare

C. *Citoplasma*
- *Organite delimitate de membrane*
  - Reticul endoplasmatic rugos
  - Reticul endoplasmatic neted } cisterne și rețele de tubuli
  - Elemente de tranziție } cisterne și rețele de tubuli
  - Aparat Golgi { vezicule mici, cisterne în stive, vezicule mari
  - *Lizozomi*

  → Compartiment intracisternal

  - Vezicule neacoperite
  - Vezicule acoperite
  - Fagozomi

  → Elemente de legătură între plasmalemă și compartimentul intracisternal

  - Mitocondrii → Compartiment mitocondrial
  - Peroxizomi
- *Matricea citoplasmatică*
- *Organite nedelimitate de membrane*
  - Poliribozomi liberi
  - Poliribozomi atașați de RER
  - Microtubuli
  - Filamente intermediare
  - Microfilamente

  → Citoschelet

  - Centrioli
  - Corpuscul bazal

  → Ansambluri de microtubuli

  - Cili
  - Flagel
  - Microvili

  → Acoperiți de membrana celulară; formează specializări celulare de suprafață

  → Ansambluri de microfilamente

  - Incluziuni citoplasmatice
    - Rezerve metabolice
      - Glicogen — granule
      - Lipide — picături
    - Pigmenți
      - Hemosiderina
      - Lipofuscina

N.B. Matricea nucleară și matricea citoplasmatică, ce comunică prin porii nucleari, formează compartimentul matriceal.

sinteza de proteine. Organitele delimitate de membrană participă într-un fel sau altul la sinteza și prelucrarea intracelulară a proteinelor și lipidelor. Sistemul lizozomal este echivalentul unui aparat digestiv intracelular. Reticulul endoplasmatic și aparatul Golgi sînt implicate în sinteza, prelucrarea și eliberarea proteinelor, glicoproteinelor, lipoproteinelor de export. Proteinele de structură sînt sintetizate de ribozomii liberi. Microtubulii și filamentele intermediare cu rol de suport, microfilamentele cu rol contractil, formează „aparatul locomotor" al celulei. Matricea citoplasmatică conține o mare varietate de molecule solubile, spre exemplu enzime, alte proteine solubile, un fond comun de monomeri utilizați în construcția macromoleculelor, ioni etc. Se admite că starea ei fizică fluctuează permanent între starea de sol (semifluidă) și starea de gel (gelatinoasă).

Vom intra în structura celulei, pe calea cea mai firească, abordînd întîi membrana celulară.

2.3. MEMBRANA CELULARĂ

Membrana celulară este structura care delimitează celula, conferindu-i individualitate, mediază și controlează interacțiunile celulei cu toate componentele mediului, fie ele molecule sau alte celule.

2.3.1. STRUCTURA ȘI ARHITECTURA MOLECULARĂ A MEMBRANEI CELULARE

Grosimea membranei celulare este de ordinul nanometrilor, de aceea la microscopul optic prezența ei poate fi doar intuită, apărînd ca o interfață între celulă și mediul extracelular. La microscopul electronic, la mărire mică (× 10 000) ea este vizualizată ca o linie unică electrondensă. La o mărire corespunzătoare (× 100 000), cînd planul secțiunii este perpendicular pe planul membranei, aceasta are o structură caracteristică, trilaminată. Ea constă din două benzi dense, fiecare cu grosimea de aproximativ 2,5 nm, separate de o bandă clară cu grosimea de aproximativ 3 nm. Celelalte membrane ale celulei (endomembranele) au același aspect general electronomicroscopic. Această structură stratificată a fost observată de D. Robertson (1958) și numită de el membrană „unit" *.

Studiul proprietăților fizice și chimice ale membranelor biologice, coroborat cu aspectul ultrastructural a dus, prin acumulări succesive, la un model în care principala componentă structurală a membranei este un bistrat de molecule lipidice polare sau amfipatice, și anume fosfolipide, glicolipide și colesterol, ce apar în raportul cantitativ 70 : 5 : 25. Membrana celulară conține de asemenea proteine. Unele sînt inserate în bistratul lipidic pe care îl traversează, de aceea se numesc *proteine transmembranare*; altele sînt asociate

* *Unit* (engl.) = etalon, unitate: structură compozită, agregat.

periferiei acestuia, de aceea s e numesc *proteine membranare periferice* (fig. 2.3). Bistratul lipidic asociat cu proteine formează partea centrală a membranei celulare, numită *plasmalemă*.

Banda luminoasă din membrană „unit" corespunde radicalilor de acizi graşi din fosfolipidele bistratului, iar cele două benzi dense reprezintă grupările polare hidrofile ale fosfolipidelor şi, parţial, proteinele asociate membranei. În ţesuturile secţionate, banda clară a membranei „unit" (a bistratului lipidic) apare continuă, deşi ea ar trebui să fie întreruptă din loc în loc de numeroasele proteine transmembranare. Acestea nu apar datorită lipsei unui contrast adecvat. Domeniile hidrofobe ale proteinelor transmembranare, asemănătoare cu radicalii de acizi graşi ai fosfolipidelor, nu pot fi contrastate cu procedeele uzuale. Ele apar însă în preparatele prelucrate prin îngheţare-fracturare, cînd membranele sînt despicate de-a lungul planului median al bistratului lipidic, iar feţele astfel expuse prezintă fie particule de aproximativ 8 nm (faţa P*), fie adînciturі complementare (faţa E**) (fig. 2.4). Aceste particule sînt considerate grupuri de proteine transmembranare. Proteinele transmembranare se inseră asimetric în bistratul lipidic. Aceasta înseamnă că *ectodomeniul* lor (partea din moleculă care proemină în mediul extracelular) diferă de *endodomeniul* lor (partea din moleculă localizată spre citosol sau mediul intracelular). Fiecare este constituit astfel, încît să interacţioneze cu ioni sau molecule diferite, în medii diferite. *Proteinele transmembranare* se mai numesc şi *proteine membranare integrale sau intrinseci*. Ele sînt menţinute în plasmalemă mai ales prin interacţiuni hidrofobe cu bistratul lipidic şi pot fi extrase din membrană numai cu detergenţi care solubilizează lipidele.

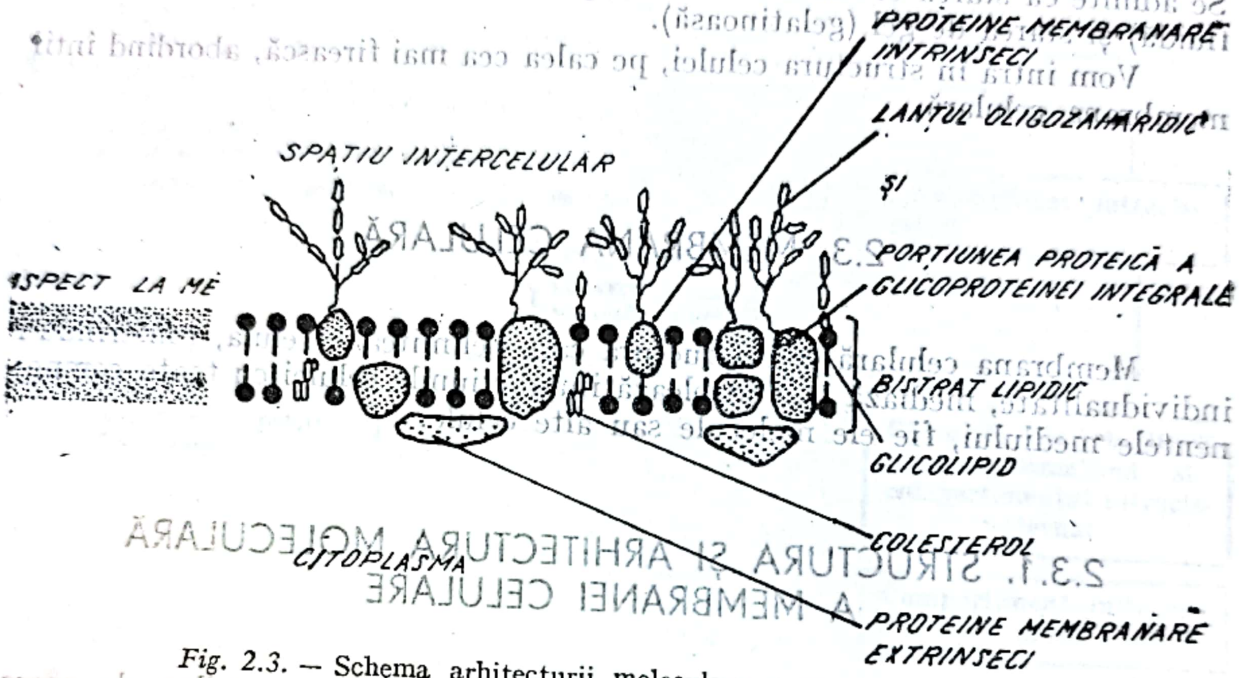


Fig. 2.3. — Schema arhitecturii moleculare a membranei celulare.

Alte proteine, numite *proteine membranare periferice* sau *extrinseci* sînt legate de bistratul lipidic prin interacţiuni slabe, multiple, hidrofile (ionice

* Faţa P = faţa hidrofobă a jumătăţii interne (plasmatice) a bistratului lipidic.
** Faţa E = faţa hidrofobă a jumătăţii externe a bistratului.

sau stereospecifice) și pot fi disociate de el cu ajutorul agenților care desfac asemenea interacțiuni (medii cu concentrație ionică foarte mică sau foarte ridicată sau reactivi ce perturbă interacțiunile hidrofile). Proteinele membranare periferice sînt asociate de preferință cu versantul citoplasmatic al bistratului lipidic. Ele constituie rețele fibrilare și funcția lor pare să fie aceea de a stabiliza infrastructurile membranei; de aceea au fost denumite global *citoschelet al membranei*. Acesta reprezintă de fapt zona periferică a citoscheletului celulei, corespunzînd citoplasmei periferice (ectoplasma) care nu conține organite celulare. Binecunoscute printre proteinele citoscheletului membranar sînt actina (G.M. 45 000 daltoni), spectrinele (G.M. 250 000 daltoni), ankirina (G.M. 200 000 daltoni) și proteina benzii 4—1*, din plasmalema

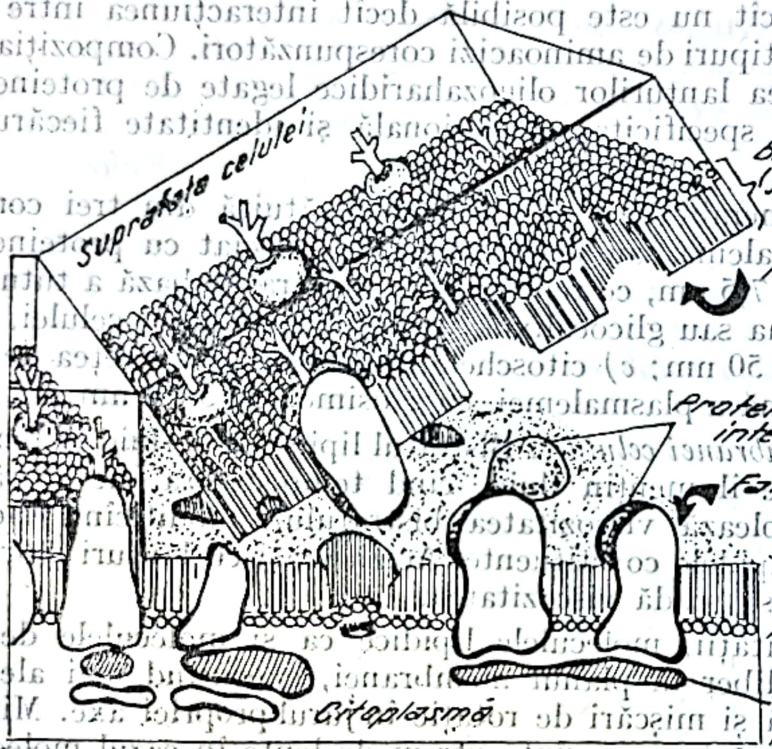


Fig. 2.4. — Clivarea membranei celulare prin procedeul înghețare-fracturare.

hematiei. Prezența actinei, împreună cu alte proteine contractile — de exemplu alfa-actinina, tropomiozina, miozina — a fost constatată *in situ* în imediata vecinătate a plasmalemei sau în fracțiunile celulare plasmalemale ale multor celule. Aceste proteine sînt probabil implicate în mișcările locale ale suprafeței celulare. În majoritatea celulelor, dacă nu în toate, citoscheletul este format din aceleași proteine. Legăturile dintre diferitele tipuri de proteine citoscheletale, ca și gradul lor de polimerizare, sînt modulate prin intermediul unor *proteine reglatoare* **.

Toate proteinele transmembranare poartă pe ectomeniul lor, iar o parte dintre moleculele lipidice ale stratului extern — pe extremitatea lor hidrofilă, lanțuri oligozaharidice, fiind deci glicoproteine și, respectiv, glico-

* Denumirea indică banda în care migrează proteina prin electroforeza în gel de poliacrilamidă.

** Gelsolina, filamina, fimbrina; calmodulina; proteinkinaze, proteinfosfataze.

lipide. Lanțurile oligozaharidice sînt deci ancorate de versantul extern al plasmalemei, formînd un înveliș al suprafeței celulare, cu aspect pufos, numit *glicocalix* (înveliș dulce). Nu se poate trasa o limită de demarcație între glicocalix și substanța din spațiul extracelular, numită *matrice extracelulară*, în compoziția căreia predomină moleculele de glucide, asociate cu proteine, sub forma proteoglicanilor și a glicoproteinelor.

Lanțurile oligozaharidice conțin între 2 și 15 monozaharide, care sînt, în ordinea frecvenței: galactoza, manoza, fucoza, glucoza, galactozamina, glucozamina, acidul sialic (N-acetil-neuraminic). Extremitățile lanțurilor și ale ramificațiilor lor sînt ocupate de acidul sialic, glucoza nefiind niciodată admisă ca monozaharid terminal. La baza lanțurilor oligozaharidice se află un anumit monozaharid care se leagă de un aminoacid specific al proteinei transmembranare, încît nu este posibilă decît interacțiunea între 5 tipuri de monozaharide și 5 tipuri de aminoacizi corespunzători. Compoziția, ordinea moleculară și așezarea lanțurilor oligozaharidice legate de proteinele transmembranare conferă specificitate funcțională și identitate fiecărui tip de celulă.

În concluzie, membrana celulară este alcătuită din trei componente principale: *a)* plasmalema sau bistratul lipidic asociat cu proteine, în grosime de aproximativ 7,5 nm, ce reprezintă structura de bază a tuturor membranelor; *b)* glicolema sau glicocalixul, învelișul glucidic al celulei, cu o grosime de aproximativ 50 nm; *c)* citoscheletul membranei, o rețea de proteine, așezate pe fața internă a plasmalemei, cu grosimea de 5—9 nm.

Fluiditatea membranei celulare. Bistratul lipidic este fluid la temperatura corpului, iar celulele îl mențin fluid, cînd temperatura înconjurătoare se schimbă. Ele controlează vîscozitatea bistratului, modificînd radicalii de acizi grași din fosfolipidele constituente. Acizii grași cu lanțuri scurte sau cei înalt nesaturați fac să scadă vîscozitatea.

Datorită fluidității, moleculele lipidice ca și moleculele de proteine integrale difuzează liber în planul membranei, executînd mai ales mișcări de translație laterală și mișcări de rotație în jurul propriei axe. Mișcările de *flip flop* *, adică de răsturnare sînt extrem de lente în cazul moleculelor de lipide ale bistratului; aceste mișcări se soldează cu trecerea lor dintr-un strat în altul și sînt o imposibilitate energetică în cazul moleculelor de proteine, ceea ce era de așteptat, avînd în vedere specializarea ecto- și endodomeniului lor. Datele experimentale indică o mișcare de translație relativ rapidă, de aproximativ 1 $\mu m/sec.^{-1}$ pentru lipide și de aproximativ 1 $\mu m/min.^{-1}$ pentru proteine, dacă în realitate aceasta nu este limitată de interacțiuni cu citoscheletul membranei sau de alți factori. Proprietățile generale ale plasmalemei (și ale tuturor membranelor din celulă) pot fi explicate prin modelul „mozaic fluid" susținut de Singer și Nicolson, conform căruia proteinele integrale, văzute ca piesele unui mozaic, plutesc singure sau agregate în bistratul lipidic fluid. Fluiditatea membranei face posibilă expansiunea ei și fuziunea membranelor fără pierderea controlului permeabilității. Acestea sînt procese absolut necesare creșterii și diviziunii celulare ca și multor altor activități celulare.

* *Flip flop* (engl.) = salt mortal.

2.3.2. FUNCȚIILE MEMBRANEI CELULARE

2.3.2.1. Difuziunea și transportul prin membrană

Bistratul lipidic funcționează ca o barieră de difuziune pentru apă și moleculele hidrofile. În schimb, moleculele liposolubile, inclusiv oxigenul și bioxidul de carbon, trec ușor prin membrană.

Permeabilitatea inerent mică a bistratului lipidic pentru moleculele hidrofile este crescută și capătă selectivitate datorită prezenței moleculelor de proteine inserate în el. Aceste proteine reprezintă: *a*) *canale (pori)* pentru diferiți ioni, prin care are loc *difuziunea pasivă* în sensul gradientului de concentrație. Din plasmalema eritrocitului uman a fost izolată, de exemplu, „proteina benzii 3" ce constituie canalul pentru anioni (clor); *b*) *transportori* specifici pentru metaboliți ca aminoacizi, monozaharide, realizînd *difuziunea facilitată*; *c*) *pompe* care concentrează preferențial anumiți ioni (de exemplu K^+) în solul celulei, în timp ce păstrează concentrația altor ioni din celulă (de exemplu Na^+, Ca^{2+}) mult sub cea din mediul extracelular. Pompele necesită energie metabolică, pusă la dispoziție de ATP (adenozintrifosfat), pentru a transporta ionii împotriva gradientului de concentrație, printr-un proces numit *transport activ*. Pompa cea mai bine studiată este ATP-aza dependentă de Na^+ și K^+, numită și ATP-aza de transport, din celulele mamiferelor. Ea este permanent în acțiune contra scurgerii pasive a acestor ioni prin pori (canale) și prin activitatea ei reglează volumul celular, controlează homeostazia, contribuie la crearea unui potențial de repaus care face ca celula să fie excitabilă, iar membrana sa conducătoare de sarcini electrice și menține concentrația intracelulară de K^+ la nivel optim cerut de activitatea multor enzime, inclusiv cele implicate în sinteza de proteine. ATP-aza de transport este o enzimă ubicuitară, dar concentrația ei variază de la un tip de celulă la altul. Concentrația ei este foarte înaltă în celulele specializate în transportul activ pe scară largă de ioni de Na^+ și K^+, cum sînt celulele epiteliului renal (nefronului), din care a și fost izolată. Ea este o glicoproteină mare, un tetramer cu două subunități, cu o greutate moleculară de aproximativ 200 000 daltoni (fig. 2.5).

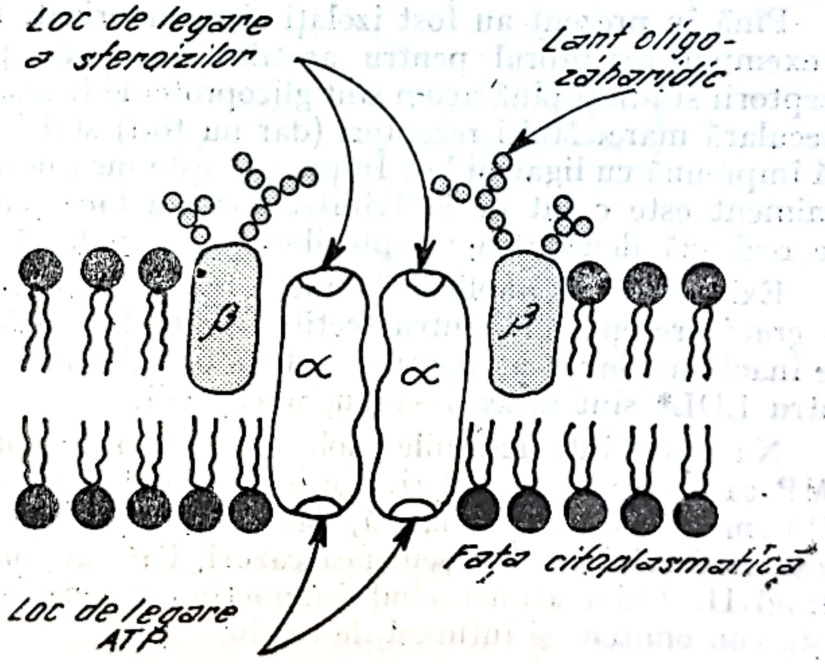


Fig. 2.5. — ATP-aza de Na^+ și K^+. Schemă.

Moleculele mari (G.M. > 10 000 daltoni) și particulele sînt *transportate „în masă"* prin *endocitoză* și *exocitoză*.

2.3.2.2. Receptorii și mesagerii

În general, plasmalema nu este permeabilă pentru moleculele hidrofile cu diametrul mai mare de 1 nm. Totuși, la om și la multe alte organisme multicelulare, celulele trebuie să răspundă la agenți fiziologici, care integrează activitatea diferitelor populații de celule cu activitatea întregului organism. Unii dintre acești agenți sînt molecule relativ mari, nepermeante. Integrarea este posibilă deoarece plasmalema celulelor-țintă este înzestrată cu molecule receptoare specifice (receptori) care interacționează la suprafața ei externă cu molecule care se leagă de aceștia în mod fiziologic (liganzi), de exemplu hormoni peptidici, neurotransmițători, imunoglobuline, lipoproteine, mitogeni etc. Unii dintre acești liganzi sînt numiți mesageri de ordinul I. În interiorul plasmalemei, receptorul activat interacționează apoi cu un sistem enzimatic care generează în citosol un mesager de ordinul II, de obicei cAMP (adenozin-monofosfatul ciclic). Al doilea mesager declanșează un lanț de reacții intracelulare care provoacă în ultimă instanță răspunsul celulei-țintă la ligandul fiziologic în cauză. Deseori aceste reacții implică fosforilarea enzimelor efectoare de către proteinkinaze.

Pînă în prezent au fost izolați și caracterizați relativ puțini receptori, de exemplu receptorul pentru acetilcolină și receptorul pentru insulină. Receptorii studiați pînă acum sînt glicoproteine transmembranare cu greutate moleculară mare. Mulți receptori (dar nu toți) sînt internalizați prin endocitoză împreună cu liganzii lor. În prezent este încă nesigur în ce măsură acest eveniment este cerut de activitatea lor sau face parte dintre mecanismele care reglează densitatea receptorilor în plasmalemă.

Există boli ce implică disfuncția receptorilor din membrană. În *miastenia gravis* receptorul pentru acetilcolină de la nivelul plăcii neuromusculare este inactivat de un autoanticorp. În hipercolesterolemia familială receptorii pentru LDL* sînt absenți sau nefuncționali.

Nu toate interacțiunile moleculă semnal-receptor generează cAMP și cGMP ca mesageri secundari. Unele dintre ele provoacă un influx rapid de Ca^{2+} în matricea citoplasmatică, datorită deschiderii canalelor de calciu ale membranei celulare. În asemenea cazuri, Ca^{2+} acționează ca un mesager de ordinul II. Chiar atunci cînd interacțiunea generează un nucleotid ciclic, crește concomitent și influxul de calciu.

În ultimii cîțiva ani s-au făcut cercetări pentru elucidarea rolului lipidelor conținînd inozitol în traducerea semnalelor extracelulare în stimuli intracelulari, care declanșează (sau controlează) o largă varietate de procese celulare: contracția, secreția, metabolismul, proliferarea etc. Ideea generală actuală asupra acestui fenomen este: interacțiunea unei molecule-semnal (de exemplu hormon) cu receptorul său membranar conduce la activarea unei fosfolipaze C membranare, care hidrolizează fosfatidilinozi-

* LDL = *Low Density Lipoproteins* — lipoproteine cu densitate mică.

tol-4,5-fosfatul (PIP_2) [format în membrane prin fosforilarea fosfatidilinozitolului (PI)], în inozitoltrifosfat (IP_3) și diacilglicerol (DAG) (fig. 2.6).

IP_3 este eliberat în citosol și determină creșterea concentrației ionilor de Ca^{2+} liberi, probabil prin eliberarea din depozitele interne ale celulei, în primul rînd din reticulul endoplasmic. Date foarte recente sugerează că IP_3 eliberează Ca^{2+} din reticulul endoplasmic activînd canalele de Ca^+ din membranele acestuia. IP_3 nu eliberează Ca^{2+} din mitocondrii.

DAG operează în planul membranei. I se atribuie următoarele roluri: *a*) stimularea proteinkinazei C (activabilă prin Ca^{2+} și dependentă de fosfolipide), care, la rîndul ei, fosforilează diverse proteine, modulîndu-le activitatea; *b*) este sursă de acid arahidonic.

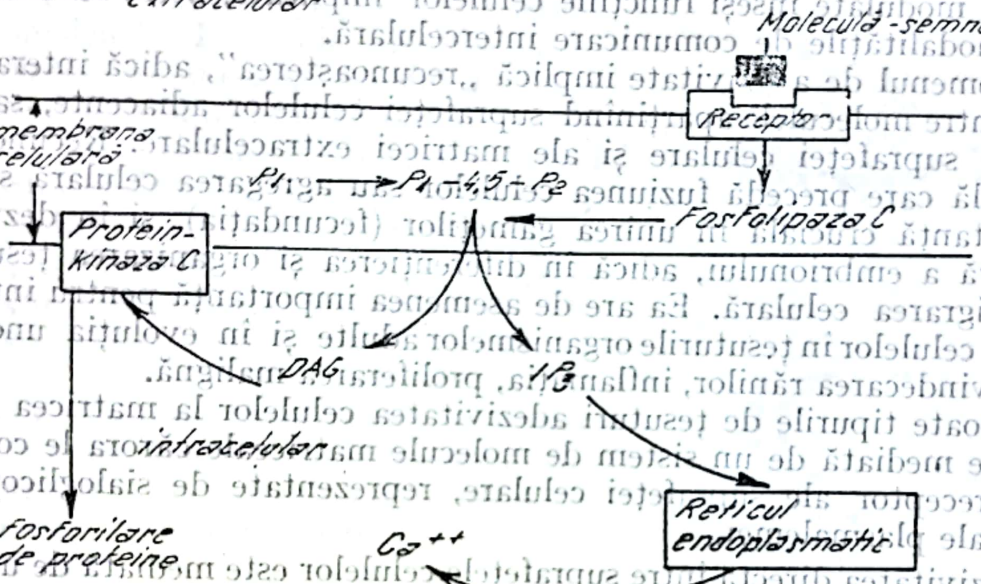


Fig. 2.6. — Reprezentarea schematică a rolurilor inozitol-trifosfatului (IP_3) și diacilglicerolului (DAG), și anume: eliberarea Ca^{2+} din reticulul endo(sarco)plasmic și activarea proteinkinazei C care fosforilează anumite proteine. IP_3 și DAG rezultă din hidroliza fosfatidilinozitolului-4, 5-difosfat ($PI\text{-}4,5\text{-}P_2$), prin intermediul unei fosfolipaze C, activabilă prin interacțiunea moleculă semnal-receptor. $PI\text{-}4,5\text{-}P_2$ se formează în bistratul lipidic al membranei printr-o dublă fosforilare succesivă a fosfatidilinozitolului (PI).

Interacțiunea proteinelor membranare integrale cu un ligand extern polivalent (de exemplu o lectină* sau o imunoglobulină) duce la agregarea lor progresivă. Fenomenul începe prin formarea unor mici pachete de receptori, situate în planul membranei, și se poate termina în condiții experimentale extreme cu agregarea pachetelor într-o singură calotă**. Aglomerarea receptorilor poate juca un rol în fiziologia normală a celulei, de vreme ce mulți liganzi fiziologici sînt polivalenți.

* Lectine (din l. lat. = a selecta) sînt proteine sau glicoproteine extrase din țesuturile plantelor sau animalelor, care se leagă selectiv de anumiți radicali glucidici ai glicoproteinelor membranare. O moleculă de lectină este polivalentă, adică leagă concomitent doi sau mai mulți radicali glucidici, formînd punți între glicoproteinele membranare.

** În literatura anglo-saxonă acest fenomen poartă denumirea de *capping*.

2.3.2.3. Molecule și structuri implicate în interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară

Membrana celulară este critic implicată în fenomenele de adezivitate și recunoaștere celulară. Adezivitatea este o proprietate generală a suprafeței tuturor celulelor și se manifestă fie *in vitro*, fie *in vivo* față de un substrat corespunzător.

In vivo se manifestă adezivitatea celulelor față de matricea extracelulară (inclusiv membranele bazale) și adezivitatea celulă-celulă. Fiecare tip de adezivitate este mediat de familii diferite de molecule, denumite generic molecule ale adezivității. Anumite molecule din sisteme diferite interacționează pentru a-și modula reciproc funcțiile, iar în final, prin această interacțiune, sînt modulate înseși funcțiile celulelor implicate, acest fenomen fiind una din modalitățile de comunicare intercelulară.

Fenomenul de adezivitate implică „recunoașterea", adică interacțiunea specifică între moleculele aparținînd suprafeței celulelor adiacente, sau între moleculele suprafeței celulare și ale matricei extracelulare. Recunoașterea celulă-celulă care precedă fuziunea celulelor sau agregarea celulară specifică are importanță crucială în unirea gameților (fecundația) și în dezvoltarea consecutivă a embrionului, adică în diferențierea și organizarea țesuturilor, ca și în migrarea celulară. Ea are de asemenea importanță pentru integrarea normală a celulelor în țesuturile organismelor adulte și în evoluția unor fenomene ca vindecarea rănilor, inflamația, proliferarea malignă.

În toate tipurile de țesuturi adezivitatea celulelor la matricea extracelulară este mediată de un sistem de molecule matriceale cărora le corespund molecule-receptor ale suprafeței celulare, reprezentate de sialoglicoproteine integrale ale plasmalemei.

Adezivitatea directă între suprafețele celulelor este mediată de un sistem de sialoglicoproteine integrale ale membranelor celulare adiacente, care au locuri de interacțiune complementare. Dintre ele au fost identificate relativ puține familii de molecule, mai ales cele ale suprafeței celulare a hepatocitelor și, respectiv, a neuronilor, la diferite specii animale.

Adezivitatea mediată de molecule și de complexe supramoleculare este denumită generic *adezivitate simplă*.

Moleculele ce mediază adezivitatea intercelulară (sau cu membrana bazală) pot fi subordonate unor structuri caracteristice, diferențieri locale ale plasmalemei și ale matricei, care dau o configurație stabilă locului de joncțiune, formînd *dispozitive joncționale speciale* (fig. 2.7). Acestea sînt prezente în toate țesuturile, dar apar în mod caracteristic în epitelii, unde celulele trebuie menținute într-o ordine corespunzătoare prin dispozitive de legătură și unde spațiile intercelulare trebuie obturate prin dispozitive de închidere *(occludens)* pentru a controla traficul extracelular (paracelular) prin epiteliu.

Dispozitivele occludente sînt structuri în formă de centură, numite joncțiuni strînse sau *zonulae occludentes**. La acest nivel plasmalema unei celule fuzionează cu plasmalema fiecăreia din celulele vecine. În preparatele de înghețare-fracturare liniile fuziunii potențiale se văd ca o serie de ridicături pe fața P a plasmalemei, interconectate cu o rețea complementară de șăn-

* *Zonula* (lat.) = mică centură.

Scanned with OKEN Scanner

țulețe fine, situate pe fața E. Numărul de ridicături succesive din *zonula occludens* pare să fie direct corelat cu „îngustimea" funcțională a joncțiunii. În afară de închiderea spațiilor intercelulare, joncțiunile strînse atașează fiecare celulă de vecinele ei.

Alte dispozitive de legătură sînt fie structuri în formă de centură (bandă), numite *zonulae adherentes*, localizate abluminal față de *zonulae occludentes*, fie dispozitive în formă de buton numite *maculae** adherentes* sau *desmozomi***. Desmozomii cuprind în structura lor elemente intra- și intercelulare. Fiecare desmozom constă dintr-o placă densă intercelulară, la același nivel cu două plăci dense intracelulare, localizate imediat sub plasmalemă. Fascicule de filamente intermediare (10 nm diametru) sînt ancorate de aceste plăci. Mărimea, complexitatea și densitatea desmozomilor cresc proporțional cu intensitatea forțelor de forfecare ce se exercită asupra epiteliului. Epiteliul stratificat al pielii (epidermul), al cavității bucale și esofagului sînt exemple edificatoare în acest sens. În anumite epitelii, elementele joncționale sînt grupate caracteristic în *complexe joncționale* în care *zonula occludens*, localizată lîngă suprafața luminală, e urmată abluminal de *zonula adherens* și de unul sau mai mulți desmozomi.

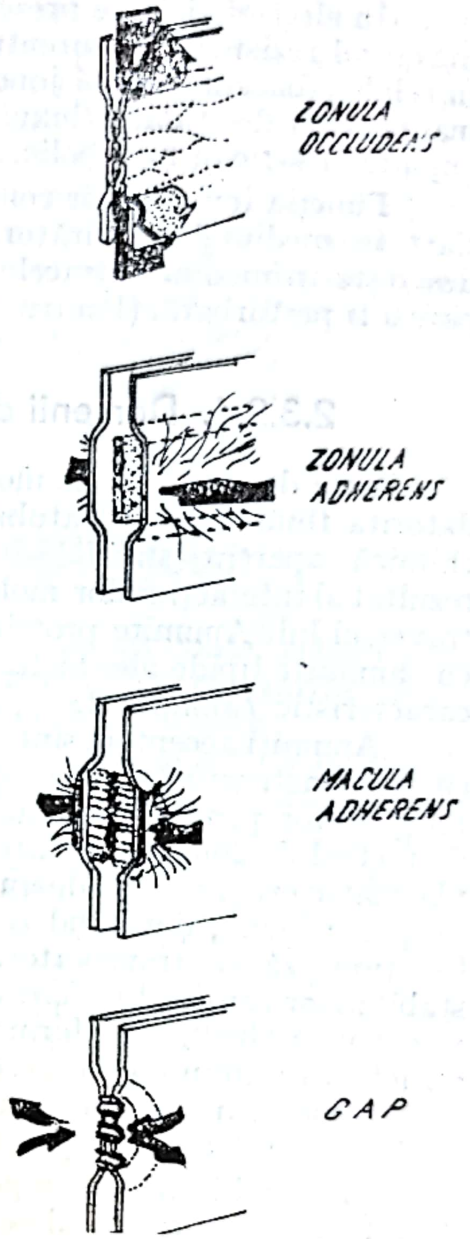


Fig. 2.7. — Dispozitive joncționale speciale. Schemă.

În afară de structurile de legătură și închidere, celulele organismelor multicelulare și-au format *joncțiuni comunicante*, numite și *joncțiuni „gap"*. În preparatele de înghețare-fracturare, ele apar ca rețele sau grupuri de particule cu diametrul de aproximativ 9 nm (pe fețele P). Fiecare particulă, numită conexon, apare formată din două subunități ce înconjură un canal central cu diametrul de aproximativ 2 nm. Dacă sînt la același nivel în cele două membrane apoziționate, conexonii formează canale intercelulare prin care ionii și moleculele mici (G.M. $\leqslant 600$) pot difuza direct de la o celulă la alta (fără pierderi în spațiul extracelular), creînd un mediu ionic comun și un rezervor comun de mici metaboliți pentru o populație mare de celule. Joncțiunile comunicante apar nu numai în epitelii ci și în alte țesuturi. Sînt în mod deosebit dezvoltate în miocard, în mușchiul neted intestinal și vascular

* Macula (lat.) = pată.

** Desmozomi (gr.) = corpi de legătură.

al tuturor mamiferelor, în sistemul nervos central al vertebratelor inferioare. Joncțiunile *gap* fac posibilă propagarea impulsurilor de la celulă la celulă controlînd astfel răspîndirea undelor contracției pe distanțe mari în mușchii viscerali și în miocard.

În electrofiziologie prezența joncțiunilor comunicante poate fi detectată măsurînd rezistența la curentul electric ce trece între doi electrozi implantați în celule adiacente. Dacă joncțiunile *gap* sînt prezente, rezistența este mult mai scăzută decît dacă fluxul electric ar trece prin plasmalemă. Celulele sînt cuplate electric și metabolic.

Funcția joncțiunilor comunicante este critic dependentă de concentrația Ca^{2+} în mediul înconjurător. Cînd concentrația Ca^{2+} crește în citosol sau descrește în mediul extracelular, joncțiunea se închide, deși structura ei nu pare a fi perturbată. (Pentru detalii asupra joncțiunilor vezi țesutul epitelial.)

2.3.2.4. Domenii diferențiate ale membranei celulare

Este de așteptat că moleculele membranei să fie distribuite uniform, datorită fluidității bistratului lipidic. Totuși, domenii cu o compoziție biochimică aparent stabilă se întîlnesc la diferite niveluri dimensionale, ca rezultat al interacțiunilor moleculare puternice în interiorul stratului sau prin traversul lui. Anumite proteine transmembranare interacționează preferențial cu anumite lipide ale bistratului, care formează în jurul lor un manșon caracteristic (*annulus*)*.

Anumiți receptori sînt menținuți în grupuri distincte prin interacțiunea cu o infrastructură stabilizatoare, cel mai cunoscut exemplu fiind acela al receptorilor pentru LDL, aglomerați în mici invaginări ale plasmalemei cu diametrul de 200 μm, numite *cavcole acoperite***, deoarece versantul lor citoplasmatic este acoperit de un înveliș caracteristic. Aceste caveole se detașează de plasmalemă, devenind *vezicule acoperite* cu diametrul de 80—100 nm, ce funcționează ca transportori în endocitoză mediată de receptori. Învelișul stabilizator constă din *clatrină*, o proteină cu greutate moleculară mare (aproximativ 180 000), care formează — prin asamblarea mai multor molecule — structuri ce amintesc de geode.

Conexonii sînt menținuți probabil la nivelul plăcii joncțiunii comunicante prin interacțiuni proteină-proteină.

În epitelii, în care un pol al celulei este expus unui mediu complet diferit de cel ce înconjură restul celulei, *zonulae occludentes* funcționează ca granițe între domenii plasmalemale cu o compoziție și o funcție foarte diferite, ceea ce conferă polaritate celulelor. Un exemplu edificator este enterocitul, celula specializată în absorbție, din epiteliul intestinal. Domeniul luminal (apical) al plasmalemei, care vine în contact cu chilul intestinal, are o structură cu mare specificitate, numită platou striat, specializată în digestia finală a alimentelor, deoarece posedă enzime membranare integrale (dizaharidaze, aminopeptidaze). Ea este de asemenea specializată pentru transportul în celulă al ionilor și al metaboliților (aminoacizi, monozaharide, lipide). Suprafața domeniului luminal este amplificată de existența unor proeminențe în formă de

* *Annulus* (lat.) = mic inel.
** *Caveola* (lat.) = cavitate mică.

Scanned with OKEN Scanner

deget, numeroase și dese, numite *microvili*, care formează împreună „platoul striat". Întreaga structură este prevăzută cu un sistem contractil, format din ansambluri de proteine contractile, care asigură mișcarea permanentă a microvililor.

Domeniile bazolaterale ale aceleași celule privesc spre fluidul interstițial al organismului și sînt specializate pentru transportul ionilor și metaboliților în afara celulei. Existența unor domenii diferențiate face posibil transportul selectiv, unidirecțional al unor ioni și molecule de o evidentă utilitate pentru întregul organism. Exemple comparabile de domenii luminale și bazolaterale se întîlnesc în multe alte cazuri (epiteliile nefronului, veziculei biliare, glandelor exocrine). Microvilii organizați ca „margine în perie" apar și la epiteliul nefronului în tubul contort proximal, iar microvili cu o dispoziție mai puțin ordonată se găsesc la suprafața multor tipuri de celule. (Pentru detalii asupra domeniilor plasmalemei vezi țesutul epitelial.)

2.4. NUCLEUL

2.4.1. NUCLEUL, SEDIU AL GENOMULUI

Nucleul *(nucleus*, karyon)* joacă un rol central în viața celulei și de aceea va fi punctul de plecare pentru trecerea în revistă a organizării celulare, în așa fel încît să-i dezvăluie semnificațiile funcționale.

Nucleul conține genomul celulei, care constă dintr-un număr definit de molecule mari de ADN, fiecare din ele avînd structura caracteristică de dublu helix a ADN-ului. În plus, nucleul conține echipamentul necesar pentru repararea genomului, pentru replicarea sa (înainte de diviziunea celulei), pentru transcrierea sa (în ARN) și pentru prelucrarea ARN-ului transcris inițial în ARNm, ARNt și ARNr (respectiv ARN mesager, ARN de transport, ARN ribozomal). Asamblarea unităților ribozomale se face și ea tot în nucleu, concomitent cu prelucrarea ARN-urilor. În sfîrșit, cel puțin o parte din echipamentul implicat în reglarea replicării genelor și transcrierii este conținut în nucleu.

Molecula de ADN este formată din două lanțuri lungi de polinucleotide, răsucite împreună sub forma unui dublu helix (fig. 2.8). Informația genetică este înscrisă în molecula de ADN, așa cum ar fi într-un șir de cuvinte și propoziții. Cele 4 baze azotate reprezintă 4 „litere" chimice care se asociază cîte trei în diferite moduri, formînd „cuvinte", numite codoni. Astfel, „propoziții" compuse din cuvinte de trei litere sînt înșirate în serie de-a lungul fiecărui lanț polinucleotidic al moleculei de ADN. Fiecare cuvînt codifică un mesaj care va fi transcris sub forma ARN-urilor, apoi transmis în citoplasmă, unde are loc decodificarea (traducerea) sub forma sintezei de proteine. Una sau cîteva combinații de trei litere reprezintă codul pentru un aminoacid. Secvența combinațiilor indică ordinea aminoacizilor în moleculă.

Gena reprezintă o secvență de nucleotide care specifică o secvență de aminoacizi, asociate cu elemente de control: un promotor, o secvență lider și un terminator. În aceeași accepțiune se mai folosește și sinonimul *cistron*.

* *Nucleus* (lat.) = sîmbure.

Gena poate conține în medie 500—1 500 de nucleotide. La organismele superioare gena ocupă un *locus* specific într-o moleculă de ADN, adică într-un cromozom.

În celulele umane lungimea totală a moleculelor de ADN este de 1,6 m. Conținutul informațional potențial al genomului este imens, după unele es-

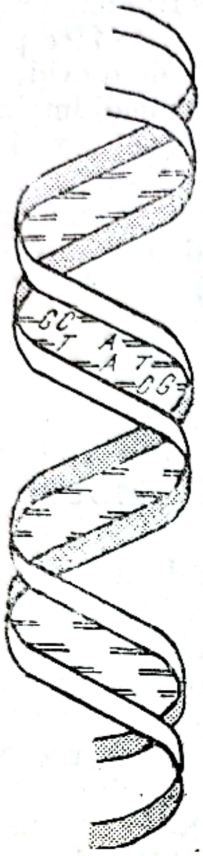


Fig. 2.8. — Schema simplificată a moleculei de ADN:
A — adenină; *G* — guanină; *T* — timină; *C* — citozină.

timări se ridică la aproximativ 9×10^{11} biți*, ceea ce reprezintă echivalentul unei biblioteci cu 180 000 de volume (dacă un cuvînt tipărit este evaluat în medie la 36 biți și dacă sînt aproximativ 150 000 de cuvinte în fiecare volum).

2.4.2. FORMA ȘI MĂRIMEA NUCLEULUI

Nucleul unei celule umane medii este un corpuscul sferic sau eliptic, cu diametrul de 3—5 μm. Aceasta dă un volum de 50 μm^3, adică 10% din volumul total al celulei. Variațiile de mărime sînt numeroase, iar variațiile de formă merg de la sfere aproape perfecte pînă la corpuri indentate, lobate, polimorfe.

2.4.3. ÎNVELIȘUL NUCLEAR

Într-o celulă eukariotă în interfază nucleul este un compartiment intracelular distinct, separat de restul protoplasmei** (adică de citoplasmă) printr-o structură formată din membrane, numită înveliș nuclear (fig. 2.9.). El constă

---

* Bit = unitatea de măsură a informației. Termenul reprezentă prescurtarea cuvintelor *binary digit* (engl. = cifră binară).

** Protoplasmă (gr. = substanța întîi formată). Se referă la substanța întregii celule, împărțită în nucleoplasmă și citoplasmă.

din două membrane succesive — membrana nucleară internă și membrana nucleară externă — organizate în *cisterna perinucleară* (un canal tridimensional) care este o parte a reticulului endoplasmic. Cisterna perinucleară se continuă cu cisterne ale reticulului endoplasmatic rugos (fig. 2.10).

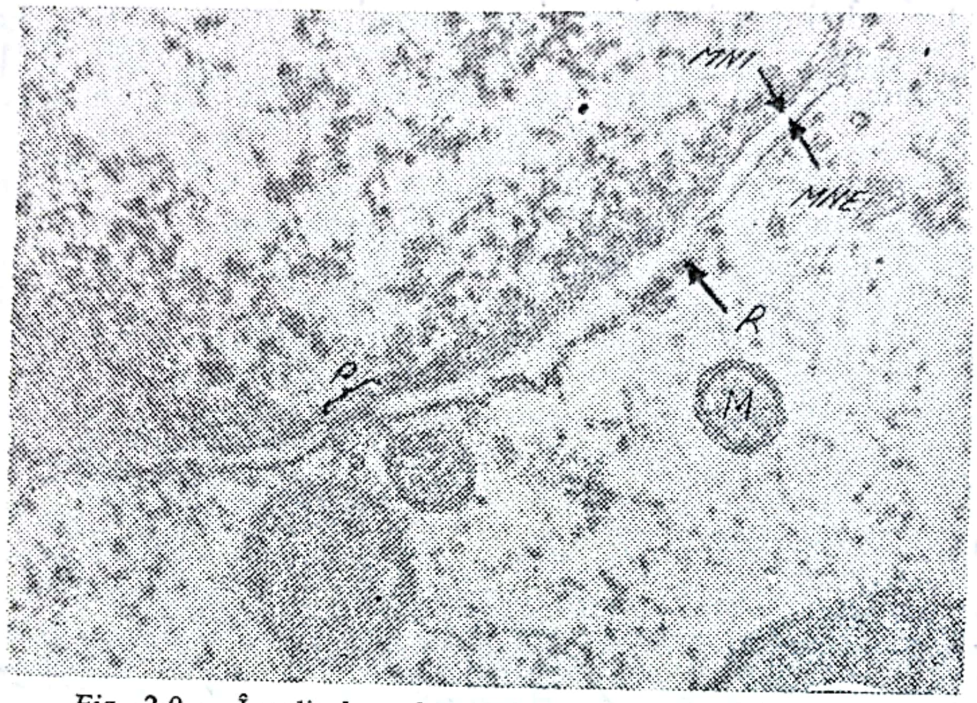


Fig. 2.9. — Învelișul nuclear. Electronomicrografie × 10 000: *MNI* — membrana nucleară internă; *MNE* — membrana nucleară externă; *R* — ribozomi atașați membranei nucleare externe; *P* — complexul por; *M* — mitocondrii.

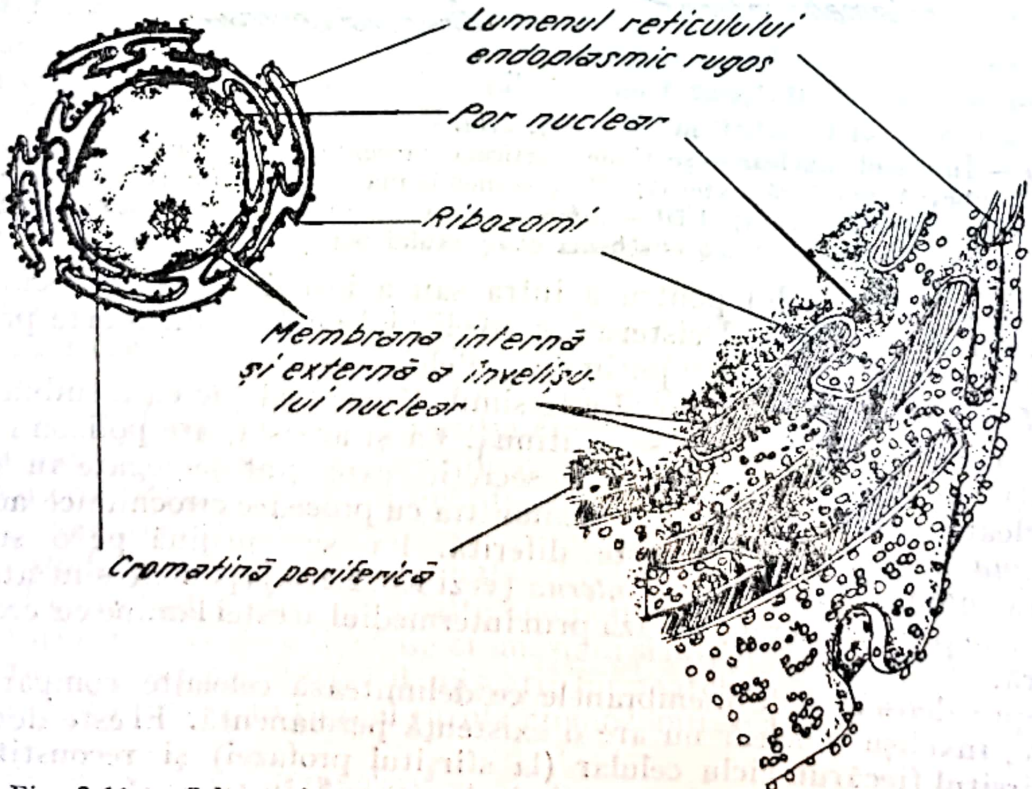


Fig. 2.10. — Schema învelișului nuclear. Cisternele perinucleare se continuă cu cisternele RER.

Scanned with OKEN Scanner

Învelișul nuclear este fenestrat și fiecare fereastră, numită *por nuclear*, are diametrul de aproximativ 80 nm și este prevăzută cu o structură complicată numită *complexul por* (fig. 2.11 a și b), care se conservă cu greutate prin metodele de preparare curente. Numărul de pori pe unitatea de suprafață pare să fie legat de intensitatea schimburilor nucleocitoplasmatice. La celulele ce cresc rapid el poate atinge 10 unități/μm^2. Porii sînt probabil „porțile" folosite de macromolecule și de ansamblurile macromoleculare (proteine, ARNm,

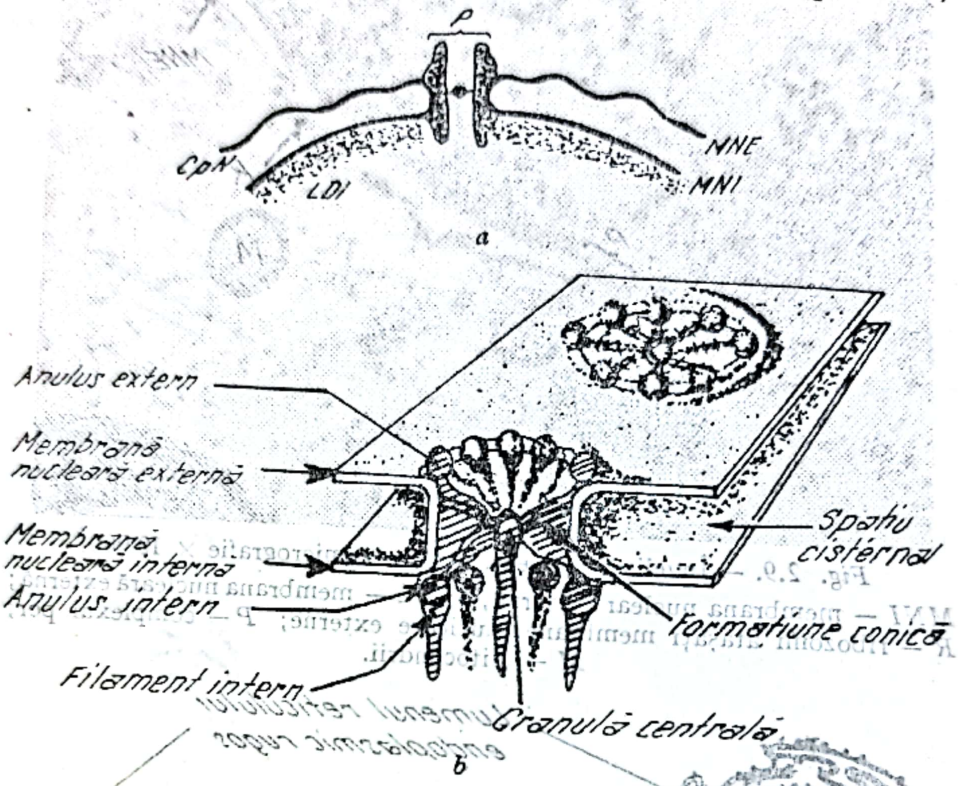


Fig. 2.11. —
a — Învelișul nuclear — secțiune verticală prezentată schematic: *MNE* — membrană nucleară externă; *MNI* — membrană nucleară internă; *CpN* — cisternă perinucleară; LDI — *lamina densa interna*; *P* — complexul por; *b* — schema complexului por.

subunitățile ribozomale) pentru a intra sau a ieși din nucleu. Schimburile dintre nucleu și conținutul cisternelor învelișului nuclear sînt foarte probabile, dar pînă acum se știe foarte puțin despre ele.

Membrana nucleară externă este similară enzimologic cu membrana reticulului endoplasmic, cu care se continuă. Ca și aceasta, are polizomi atașați, implicați în sinteza de proteine de secreție, care sînt segregate în cisterna perinucleară. Acest fapt se poate demonstra cu procedee citochimice adecvate. *Membrana nucleară internă* este diferită. Ea se sprijină pe o structură lamelară, numită *laminadensa interna* (vezi fig. 2.11 a) (pe care sînt atașate și complexele por) și interacționează prin intermediul acestei lamine cu cromatina nucleară.

Spre deosebire de membranele ce delimitează celelalte compartimente celulare, învelișul nuclear nu are o existență permanentă. El este dezagregat spre sfîrșitul fiecărui ciclu celular (la sfîrșitul profazei) și reconstituit din fragmentele sale dispersate către sfîrșitul mitozei*, în telofază.

* *Mitosis* (gr.) stare filamentoasă.

2.4.4. NUCLEOPLASMA

2.4.4.1. Cromozomii. Cariotipul. Ciclul celular

În timp ce celula se pregătește pentru diviziune, în nucleoplasmă devin progresiv vizibile la microscopul optic niște corpuri filamentoase, lungi. Ele au o mare afinitate pentru coloranții bazici și din acest motiv se numesc *cromozomi**. Acest proces durează aproximativ o oră și la sfîrșitul acestui interval, numit *profază*, învelișul nuclear se desface în cisterne mici separate. În timpul stadiului următor, numit *metafază*, fiecare cromozom, acum plutind în citoplasmă, ia o formă caracteristică de bastonaș, prin condensare progresivă. Din acest motiv, metafaza este stadiul în care morfologia generală a întregului set de cromozomi ai celulei poate fi studiată în condițiile cele mai favorabile. Introducînd celulele într-o soluție hipotonă, după strivirea și colorarea lor cu coloranți adecvați, se etalează cromozomii și sînt evidențiate detalii diagnostice, deoarece prin colorare fiecare cromozom prezintă un set de benzi caracteristice.

Studiul setului de cromozomi sau *cariotipul* a dus la următoarele concluzii: *a)* numărul de cromozomi este constant în toate celulele unei anumite specii. La om, numărul de cromozomi este 46, cu excepția gameților masculini și feminini care au 23 de cromozomi fiecare; *b)* în toate celulele cromozomii apar în perechi — 23 de perechi la om, iar în fiecare pereche cei doi componenți, numiți *cromozomi omologi*, sînt morfologic identici. Există, însă, o excepție importantă: masculul (la om și la toate mamiferele) are doi cromozomi neperechi, numiți X și Y, în timp ce femela are o pereche de cromozomi X. Deoarece (cu excepția menționată) cromozomii apar în duplicat, cariotipul este numit *diploid*.

Dacă mergem pe linia diviziunilor celulare înapoi pînă la diviziunea primă a oului, atunci se vede că un omolog este moștenit de la mamă, de la gametul femel haploid (ovocit), iar celălalt de la tată, din gametul mascul haploid (spermatozoid).

La organismele diploide fiecare genă există în dublu exemplar, una pe cromozomul patern și cealaltă pe cromozomul matern, genele perechi numindu-se *alele*.

Observațiile arată că fiecare cromozom, în metafază, se clivează de-a lungul său în două jumătăți simetrice, numite *cromatide*, și că fiecare cromatidă e prevăzută cu o structură în formă de disc, numită *cinetocor***, ce se atașează de microtubulii fusului mitotic. Poziția cinetocorului variază de la o specie la alta. La om, el este așezat aproape de centrul fiecărei cromatide. La sfîrșitul metafazei cromatidele se separă una de alta și de acum înainte fiecare din ele va fi un cromozom distinct.

În stadiul următor, numit *anafază*, microtubulii atașați cinetocorului, acționînd concertat cu toate celelalte componente ale fusului mitotic, separă două seturi complete de cîte 46 de cromozomi și mișcă fiecare set către cei doi poli ai fusului mitotic. Sfîrșitul mișcării lor marchează începutul unui nou stadiu, numit *telofază*, în timpul căruia cromozomii se adună în grup, învelișul

* *Chromosoma* (gr.) = corp colorat.

** Noțiunea de cinetocor nu este sinonimă cu cea de *centromer* ce desemnează locul de unire a celor două cromatide.

nuclear este reasamblat în jurul lor, iar nucleul devine un compartiment distinct al celulei pentru tot restul ciclului celular.

Întregul proces ce începe cu condensarea cromozomilor și se termină cu formarea a doi nuclei-descendenți, se numește *mitoză*. Mitoza durează aproximativ 2 ore, de la sfîrșitul profazei pînă la sfîrșitul telofazei. În telofază corpul celulei-mame se divide prin *citokinesis*. Fiecare dintre celulele-fiice intră într-o *interfază* relativ lungă (aproximativ 22 ore), în timpul căreia sintetizează întii macromolecule (ARN, proteine, lipide, polizaharide), necesare existenței ei și viitoarei ei progenituri. Această perioadă activă, denumită G_1 („G" de la

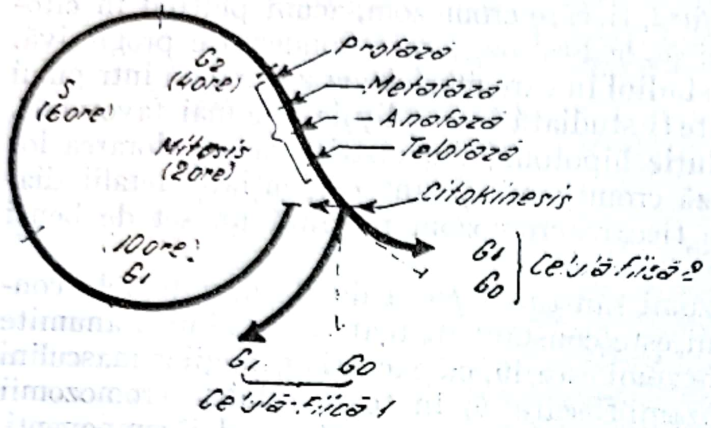


Fig. 2.12. — Schema ciclului celular al unei celule cu o durată de viață de 24 ore: $G_1+S+G_2=$ = interfaza.

gap) durează aproximativ 10 ore și este urmată de un interval de 8 ore numit S (de la sinteză), timp în care genomul celulei, adică ADN-ul ei, se replică. Intervalul S este urmat de un stadiu scurt și oarecum inactiv, G_2, la sfîrșitul căruia celula intră din nou în mitoză. G_1 se interpune între sfîrșitul mitozei și S, G_2 între S și începutul mitozei (fig. 2.12).

În procesul diferențierii celulare multe celule părăsesc ciclul și progresează de la G_1 la un stadiu numit G_0, care se poate menține nedefinit, fără să ducă la S. În țesuturile organismului uman nucleul marii majorități a celulelor este în interfază, deoarece multe celule diferențiate sînt oprite în G_0 și fiindcă mitoza celulelor care se divid este de 10 ori mai scurtă decît interfaza lor.

2.4.4.2. Eucromatina și heterocromatina

La începutul lui G_1 cromozomii înalt condensați din telofază încep să se despiralizeze, pentru a permite moleculelor de ADN să fie transcrise. Procesul variază ca amplitudine de la un cromozom la altul și conduce în final la rezultatele următoare. Identitatea morfologică a cromozomilor se pierde, deși identitatea lor moleculară este păstrată, cel puțin pentru ADN și histone. Cromozomii sau segmentele lor pe care se face *transcripția activă* capătă o structură *laxă;* ei poartă în totalitate numele de *eucromatină**. Segmentele cromozomilor *neimplicate în transcripție* se decondensează numai parțial. Ele apar ca mase relativ *dense*, puternic colorate cu coloranți bazici, numite în totalitate *heterocromatină***. E de așteptat ca mărimea și distribuția maselor

* Eucromatină (gr.) = cromatină adevărată.

** Heterocromatină (gr.) = altă cromatină.

de heterocromatină să se schimbe în timp, din moment ce diferite segmente ale cromatinei devin accesibile transcripției. Numai în mod excepțional segmente ale cromozomilor sau cromozomi întregi sînt inactivate pe durata întregului ciclu celular. Un exemplu tipic este unul dintre cei doi cromozomi X ai mamiferelor femele. El persistă tot timpul interfazei ca o masă permanentă de heterocromatină atașată învelișului nuclear. Este cunoscut sub denumirea de *corpuscul Barr* (heterocromatină facultativă gonozomică) și este folosit pentru a diagnostica sexul genotipic, prin examinarea celulelor persoanei respective.

În procesul diferențierii celulare, multe celule rămîn blocate în G_1 (neuronii, celulele musculare cardiace) sau trec în G_0 (celulele-sușe). Ca rezultat al activității lor specializate de biosinteză, transcrierea genomului lor este restrînsă la anumite gene, iar distribuția heterocromatinei lor capătă tipare caracteristice. O celulă ce reintră în ciclul celular din G_0 convertește o mare parte din heterocromatina sa (heterocromatina facultativă autozomală) în eucromatină, în timp ce într-o celulă degenerată, în care transeripția se apropie de un punct mort, majoritatea cromatinei este condensată în mase confluente de heterocromatină, stare numită *piknoză*.

Aspectul diferit al heterocromatinei este folosit în scop diagnostic la identificarea tipurilor celulare și evaluarea nivelului general de activitate a celulei (fig. 2.13 a și b).

În majoritatea celulelor, heterocromatina formează un înveliș discontinuu, situat imediat sub învelișul nuclear. Discontinuitățile sînt canale ce duc la porii nucleari. Un înveliș de heterocromatină se găsește de obicei în jurul nucleolilor (fig. 2.14).

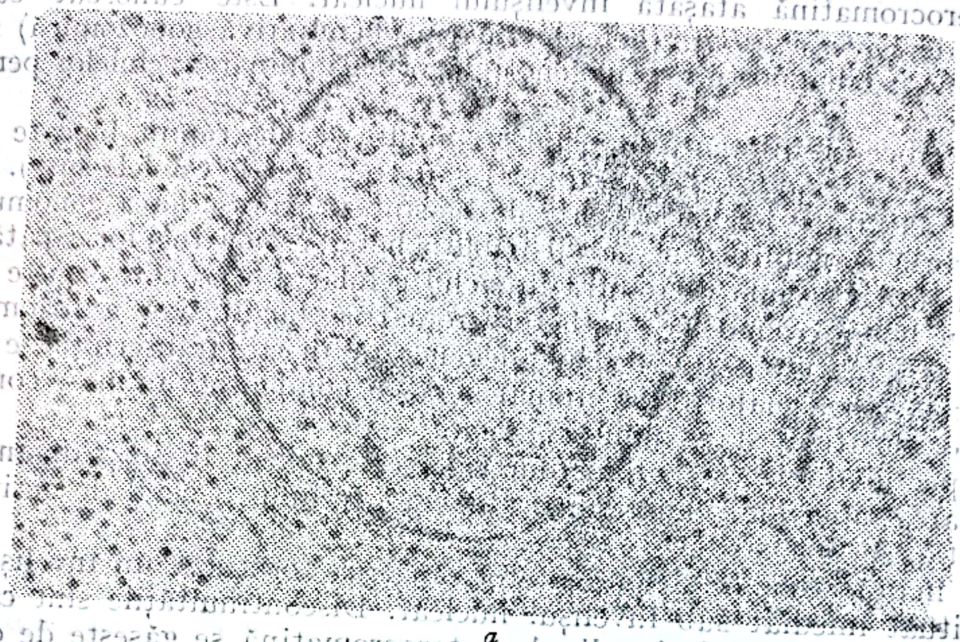
Fibrile de cromatină și nucleozomi. Indiferent de starea în care se află — laxă, condensată (nuclei în interfază) sau hipercondensată (cromozomi în metafază) —, cromatina poate fi descompusă pînă la o unitate structurală comună, numită *fibrila de cromatină*, ce prezintă o morfologie caracteristică (fig. 2.15).

Ea constă dintr-un fir cu lungime considerabilă, ce interconectează o serie de mărgele cu diametrul de aproximativ 10 nm. Fiecare mărgea este un octamer format din patru proteine, numite *histone*, iar firul asociat cu ea este un segment de 200 de baze perechi, din molecula de ADN în formă de dublu helix. Acesta este înfășurat în jurul fiecărei mărgele și se întinde de la o mărgea la alta ca *linker* cu o lungime de 4—5 nm. Octamerul histonic împreună cu unul din linkerii săi constituie unitatea repetitivă a fibrilei de cromatină, numită *nucleozom*. Adăugarea altei histone la linkeri schimbă șirul de mărgele într-o spirală relativ strînsă, cu diametrul de aproximativ 30 nm. Histonele sînt proteine cationice, cu greutate moleculară relativ mică, între 12 000 și 20 000 daltoni. În prezent nucleozomul este considerat unitatea de împachetare a genomului, un dispozitiv structural care face posibilă acomodarea unui genom întreg, cu lungimea totală de aproximativ 1,6 m, la un compartiment nuclear mic, cu diametrul sub 5 μm. Genele pot fi transcrise fără să se desfacă nucleozomii, deoarece moleculele de ADN sînt accesibile la nivelul micilor adîncituri de la suprafața mărgelelor.

În prezent se acceptă că fiecare cromozom conține sau este organizat pe baza unei singure molecule de ADN care, dacă ar fi întinsă, ar avea lungimea de aproximativ 10 cm, la om. De vreme ce cromozomii umani cei mai lungi nu depășesc 10 μm, rezultă că spiralizarea și condensarea din pro-

Scanned with OKEN Scanner

metafază duc la o structură de 10^4 ori mai scurtă decît molecula de ADN pe care o conţin. Primul nivel al împachetării — prin nucleozomi — dă o structură (fibrila de cromatină) de numai 6 ori mai scurtă ca molecula de ADN ce o compune. Aceasta înseamnă că se produce o împachetare considerabil mai mare, intracromozomial, în timpul profazei şi metafazei. Procesul este în mod evident



a

b

Fig. 2.13. — *a* — Nucleu eucromatic. Electronomicrografie × 2 000. *b* — Nucleu heterocromatic. Electronomicrografie × 5 000.

bine controlat, de vreme ce fiecare cromozom apare cu aceeaşi morfologie specifică în fiecare metafază.

Tipuri de secvenţe ale ADN. În fiecare moleculă de ADN şi în întregul genom există secvenţe înalt repetitive, care se replică dar nu sînt transcrise.

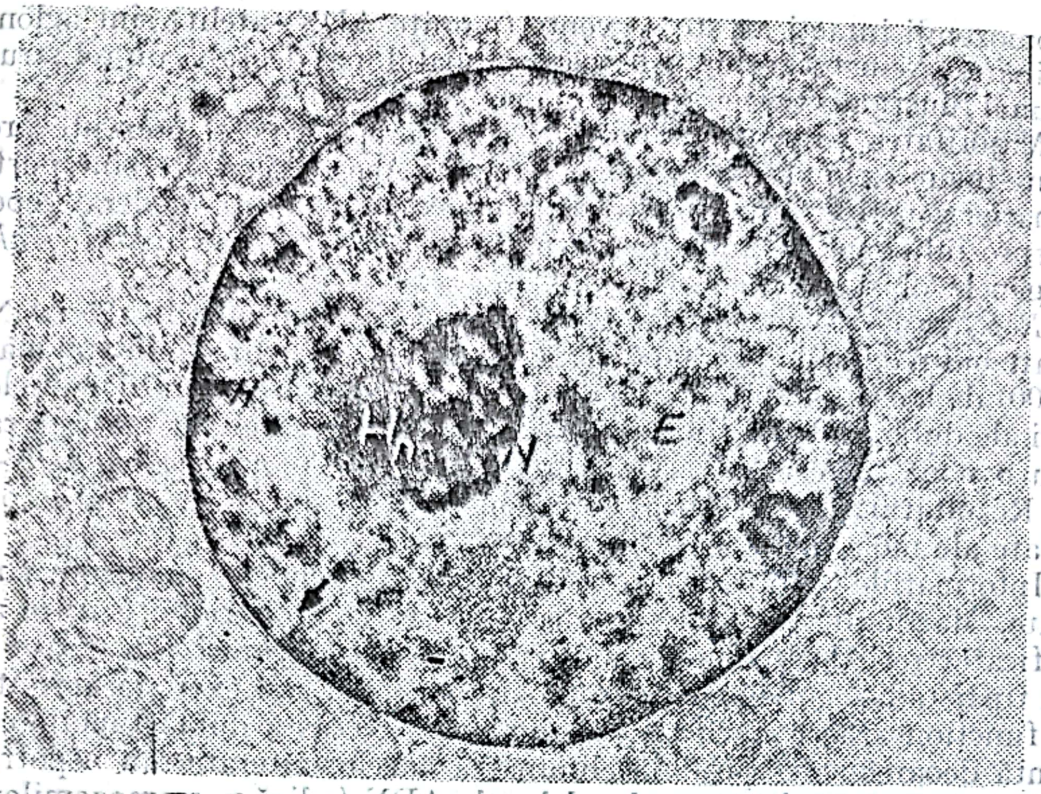


Fig. 2.14. — Nucleu. Electronomicrografie × 2 800: *H* — heterocromatina asociată versantului intern al MNI; *Hn* — heterocromatina asociată nucleolului; discontinuități în dreptul porilor nucleari; *N* — nucleol; *E* — eucromatină.

Fig. 2.15. — Nucleozomii și fibrila de cromatină. Schemă. *1* — Fiecare nucleozom constă dintr-un miez și un *linker*; miezul este un copolimer (octamer) histonic de formă discoidală, construit după formula: 2(H2a + H2b + H3 + H4); un lanț dublu helicoidal de ADN este înfășurat în jurul fiecărui miez pe lungimea a 140 de perechi de baze azotate. *Linker*-ul este segmentul neînfășurat al ADN, cu o lungime de 60 de baze azotate. Acest lanț flexibil de nucleozomi are grosimea de 10 nm. *2* — Adăugarea de H_1 la lanțurile de nucleozomi *in vitro* mărește gradul de înfășurare a ADN și duce la formarea fibrilei de cromatină, o panglică mai compactă, cu grosimea de 20 nm. *3* — Dacă este mărită progresiv concentrația ionică a mediului, fibrila de cromatină se spiralizează, devine și mai compactă, structură numită *solenoid*, cu grosimea de 25—30 nm. Fiecare spiră cuprinde 6 nucleozomi. Se admite că aceleași evenimente se produc și *in vivo*.

În cromozomii intacți aceste secvențe (numite ADN-satelit) sînt aglomerate în vecinătatea cinetocorului. Ele joacă probabil mai degrabă un rol structural decît unul funcțional (heterocromatină constitutivă).

Majoritatea secvențelor de ADN sînt nerepetitive și prezente probabil într-un singur exemplar *per* genom haploid. Aceste secvențe sînt purtătorii informației genetice. Între aceste extreme există secvențe moderat repetitive care reprezintă gene redundante și separatori *(spacers*)* sau linkeri *(linkers**)* între genele obișnuite.

Replicarea ADN-ului. În timpul fazei S, moleculele de ADN sînt replicate bidirecțional, plecînd de la un număr foarte mare (probabil mai mare de 1 000) de locuri de inițiere a replicării pentru fiecare cromozom. Cele două lanțuri ale dublului helix sînt local desfășurate și fiecare lanț servește ca tipar pentru o nouă moleculă de ADN produsă de *ADN polimeraza-ADN-dependentă*. Rezultatul acestei replicări semiconservative sînt două copii de o înaltă fidelitate ale moleculei de ADN originare.

Informațiile despre replicarea ADN-ului în celulele eukariote sînt încă limitate. Mai mult se știe despre acest proces la prokariote, în care au fost identificate trei ADN-polimeraze diferite (la *Escherichia coli*). Toate depind de un tipar (adică un singur lanț de ADN) pentru a-și exercita activitatea și toate funcționează ca nucleaze și polimeraze. Această dublă funcție este importantă deoarece face posibilă eliminarea bazelor alterate sau nepotrivite și recondiționarea completă a moleculelor de ADN (adică a cromozomilor) atîta timp cît cele două lanțuri de ADN nu sînt alterate la același nivel. ADN-polimerazele produc secvențe scurte care sînt apoi legate una de alta de către alte enzime, numite *ADN-ligaze*. Replicarea se desfășoară de-a lungul unor linii similare în celulele eukariote.

Enzimele ce repară ADN-ul sînt deficiente în boala congenitală *xeroderma pigmentosum*, în care pe pielea persoanei bolnave se dezvoltă tumori maligne multiple, ca rezultat al sensibilității ridicate la soare și razele ultraviolete (radiațiile ultraviolete sînt cunoscute ca sursă de alterare a ADN-ului).

Replicarea cere probabil desfacerea nucleozomilor și producerea și asamblarea coordonată a histonelor, astfel încît să genereze o fibră de cromatină adițională. Fiecare copie a ADN-ului devine componenta principală a unei cromatide, care, la rîndul ei, devine din ce în ce mai vizibilă pe măsură ce celula se apropie de metafază. De la sfîrșitul fazei S pînă la sfîrșitul metafazei, cele două cromatide-surori rămîn atașate una de alta. Deci, orice cromozom în profază sau metafază conține informația genetică în duplicat. De vreme ce fiecare cromozom are un omolog, genomul este prezent în cvadruplicat după sfîrșitul fazei S. El va fi redus iarăși la duplicat în telofază.

ARNhn-urile și ARNm. În eucromatină transcripția genelor este îndeplinită de *ARN-polimeraze-ADN-dependente* care sînt specific inhibate de alfa-amanitină, toxina ciupercii *Amanita phalloides*. Transcriptele primare sînt moleculele mari și heterogene de ARN denumite ARN hn-uri („hn" sînt inițialele cuvinelor „heterogen nuclear"). Se știe că prelucrarea lor intranucleară implică mari pierderi de ARN dar s-a aflat doar recent că în timpul acestei prelucrări, lungi secvențe interne (numite *introni)* ale transcriptului primar sînt îndepărtate. Secvențele rămase (numite *exoni)* se îmbină cap la cap pentru a produce ARNm-urile funcționale. Îmbinarea se produce în locuri

* *Spacer* (engl.) = care separă.
** *Linker* (engl.) = care leagă.

multiple și, cu excepția ARNm-urilor pentru histone, afectează toate transcriptele primare investigate pînă în prezent. Această descoperire stabilește o deosebire fundamentală între procariote și eucariote în privința transcripției genelor, deoarece îmbinarea genelor apare numai la eucariote. Semnificația acestui fel de prelucrare este încă în discuție. S-a afirmat că ea a accelerat evoluția, dar este clar că are și efecte imediate, de vreme ce transcriptele neprelucrate sînt reținute și degradate în interiorul nucleului.

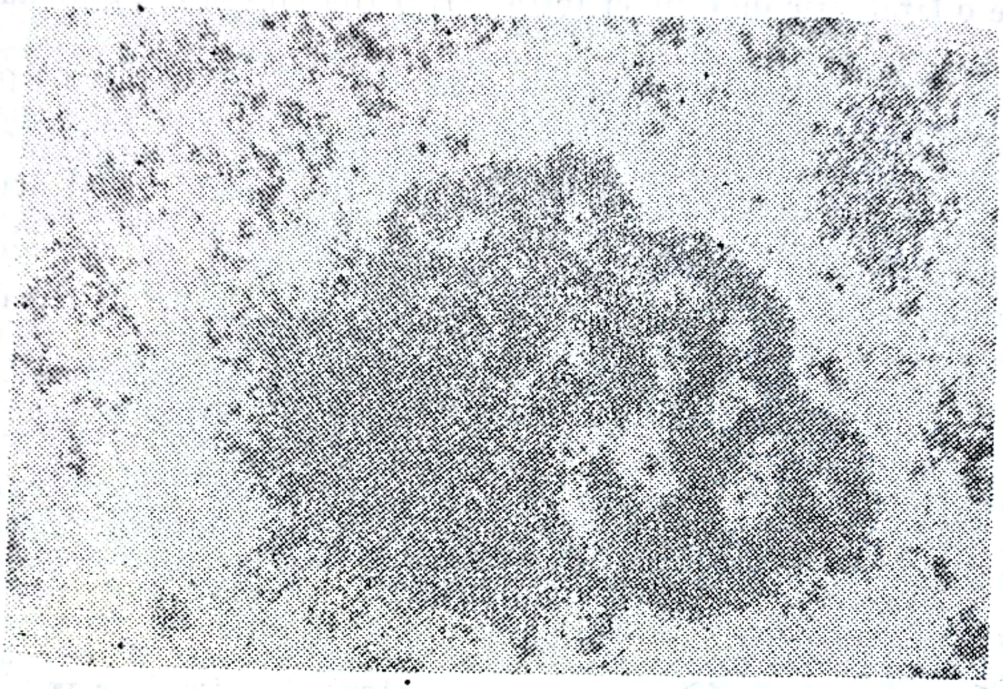


Fig. 2.16. — Nucleol. Electronomicrografie × 7 200: detaliu din figura 2.14.

Cînd încă se află în nucleu, ARNm-urile prelucrate sînt înzestrate cu „capișoane" protectoare la capătul 5' (capișonul are o guanozină metilată și protejează capătul 5' de fosfataze și nucleaze). În același timp, ele se lungesc la capătul 3' prin adăugarea de secvențe poli-A (poliadenilice), complexate cu un număr mic de proteine specifice, iar în final sînt transferate în citoplasmă ca particule de ribonucleoproteine.

2.4.4.3. Nucleolul

Nucleul în interfază conține doi sau mai mulți corpusculi globulari, cu diametrul de aproximativ 0,5 μm, numiți nucleoli *(nucleolus)* (fig. 2.16). Numărul lor este în legătură cu gradul de ploidie al nucleului (un nucleol pentru un genom haploid), iar mărimea lor reflectă intensitatea producției de ribozomi și deci intensitatea sintezei de proteine destinate creșterii celulare sau secreției. Aceasta explică de ce nucleolii sînt bine vizibili în celulele ce cresc rapid, inclusiv în celulele canceroase, ca și în celulele ce sintetizează și eliberează prin secreție o mare cantitate de proteine.

În electronomicrografii nucleolul apare înconjurat de un înveliș de heterocromatină care variază considerabil ca mărime de la un tip celular la altul. În contrast cu marea majoritate a genelor care sînt prezente în două exemplare *per* genom, genele ce codifică ARN-urile ribozomale sînt redundante. Numărul de exemplare atinge 400 de celulele somatice umane și depășește

Scanned with OKEN Scanner

4 000 în ovocitele anumitor amfibieni. În multe celule unele dintre aceste gene redundante nu sînt transcrise, ele formează în jurul fiecărui nucleol învelișul de heterocromatină asociată nucleolului (*pars chromosoma*). Nucleolul însuși poate fi descompus în două părți cu structură diferită. Una este fin fibrilară (*pars fibrosa*), cealaltă granulară (*pars granulosa*). O parte amorfă (*pars amorpha*) este observată de asemenea în unii nucleoli. Geometria acestor părți este complexă și variabilă. Caracteristica structurală principală este o largă arie de contact între partea fibrilară și cea granulară (vezi fig. 2.16).

Organizarea nucleolului a fost analizată printr-o varietate de procedee, incluzînd analiza biochimică a nucleolilor izolați, teste de digestie enzimatică efectuată *in situ* și autoradiografie după incorporarea precursorilor radioactivi de ARN. Aceste studii au stabilit că genele ribozomale ce sînt activ transcrise, formează bucle de eucromatină care pătrund în partea fibrilară, unde sînt transcrise de o *ARN-polimerază-ADN-dependentă* specială, care este inhibată de actinomicina D. Transcriptul primar ce rezultă în urma acțiunii polimerazei este o singură moleculă de ARNr 45S, care este intens prelucrată în nucleol prin modificări enzimatice (metilarea bazelor și clivare), pentru a da în final un ARN 28S și un ARN 18S, respectiv pentru unitățile ribozomale mare și mică. Asamblarea ARNr-ului în *particule ribozomale* (prin formarea de complexe cu proteine) se produce concomitent cu transcripția. În acest proces sînt folosite două tipuri de proteine: *proteine nucleolare* care funcționează ca un eșafodaj temporar și *proteine ribozomale* care

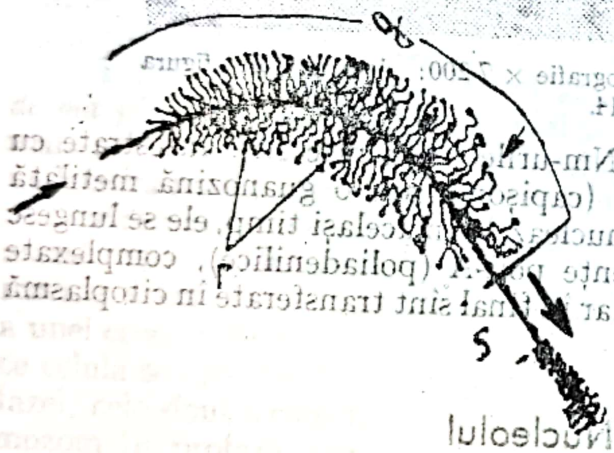


Fig. 2.17. — Genele (rADN) ce codifică ARN-urile ribozomale, vizualizate prin dispersarea nucleolilor din ovocitul de amfibian. Fiecare genă în transcripție activă are forma unei frunze de ferigă. Nervura centrală este gena însăși (*g*); ea se continuă cu un „spacer" (*s*) care nu este transcris. Punctele de pe genă sînt ARN polimeraze ADN-dependente. Nervurile laterale sînt transcriptele inițiale, iar particulele de la extremitățile lor (*r*) sînt subunități ribozomale în curs de asamblare. Asamblarea lor se produce paralel cu transcripția. Direcția transcripției este indicată de →, iar direcția asamblării de >.

devin parte componentă a produselor finale. Particulele ribozomale sînt asamblate și stocate temporar în partea granulară, înainte de a fi exportate în citoplasmă (trecînd foarte probabil prin porii nucleari). Unitățile ribozomale mici apar în citoplasmă mai rapid decît unitățile ribozomale mari. Micrografiile obținute după etalarea nucleilor tratați cu detergent pe un suport adecvat (film de carbon) demonstrează în detaliu redundanța genelor ribozomale, transcrierea lor concomitentă de către un mare număr de ARN-polimeraze-ADN-dependente și asamblarea ARNr-urilor în particule ribozomale, ce se produce în tandem cu transcripția (fig. 2.17).

În profază, nucleolul descrește progresiv ca mărime, deoarece transcripția ADNr-urilor* este oprită și în final dispare (în multe celule, dar nu în

* ADNr = gene care codifică ARNr.

toate), în timp ce ADNr-urile sînt încorporate de obicei într-o singură pereche de cromozomi. La începutul lui G_1 producția de ribozomi începe din nou de la *organizatorii nucleolari*, adică părțile cromozomilor în care sînt înglobate ADNr-urile redundante.

2.4.4.4. Alte componente ale nucleoplasmei

În afară de heterocromatină, eucromatină și nucleoli au fost descrise în nucleoplasmă și alte entități structurale. Acestea sînt *granulele pericromatiniene* (diametru 30 nm) la periferia maselor de heterocromatină și *granulele intercromatiniene* (diametru 20 nm) care apar în grupuri în eucromatină. Nici una, nici alta nu sînt complet caracterizate chimic și funcțional.

Nucleii conțin, pe lîngă histone, un mare număr de *proteine nehistonice* — mai mult de 100 —, la nivelul actual de rezoluție al electroforezei. Majoritatea lor sînt anionice. După fracționarea nucleului multe dintre aceste proteine se regăsesc în fracțiunile de cromatină. Proteine similare se găsesc în cromozomii izolați. Enzimele implicate în sinteza de repararea ADN-ului, ca și cele implicate în sinteza ARN-ului — adică în transcrierea genelor — se numără printre aceste proteine nehistonice. Ele se găsesc asociate cu moleculele de ADN ale genomului, în timpul replicării și transcrierii. Multe alte proteine nehistonice nu au o funcție bine caracterizată. În prezent se acceptă că unele din ele sînt implicate în prelucrarea transcriptelor pentru fiecare tip de ADN (prin scindare, îmbinare, modificări chimice) iar multe altele se presupune că sînt implicate în mecanismele care reglează replicarea, transcripția și împachetarea genomului. Pînă acum numai puține proteine reglatoare au fost caracterizate și aceasta numai parțial. Ele leagă hormonii steroizi sau hormonii tiroidieni fiind implicate în controlul hormonal (modularea) al transcripției.

2.5. CITOPLASMA

Așa cum am menționat, citoplasma este foarte compartimentată. Ea conține o serie de 10 tipuri distincte de compartimente, fiecare din ele mărginit de propria sa membrană. Aceste compartimente variază ca morfologie, biochimie (a membranelor și a conținutului) și ca funcție. Ele sînt toate incluse într-un compartiment comun continuu, denumit *matrice citoplasmatică* (hialoplasmă; citoplasmă fundamentală). Matricea citoplasmatică are două componente: faza fluidă — *citosolul* — format din apă, electroliți, molecule organice mici și proteinele solubile și faza solidă ce conține un mare număr de ansambluri moleculare care se comportă ca structuri solide.

Multe dintre componentele matricei pot forma geluri reversibile. În faza solidă intră *organitele nedelimitate de membrane* care îndeplinesc activități celulare importante, într-o strînsă interdependență cu elementele citosolului. Din această categorie fac parte: a) *„aparatul locomotor" al celulei* constînd din: ansambluri de susținere sau de ghidare (*microtubulii* și *filamentele intermediare*) ce pot fi considerate ca echivalente unui schelet intern și numite din acest motiv *citoschelet*; în citoschelet se asociază și ansambluri

contractile reprezentate de *microfilamente* de actină și miozină ce interacționează cu un mare număr de alte proteine (alfa-actinină, tropomiozină, troponine, calmodulina, spasmina), implicate în contracție și reglarea contracției; o rețea extrem de fină, tridimensională, descrisă ca *rețea microtrabeculară*; ansambluri de microtubuli sau ansambluri de microfilamente ce formează centriolii și fusul mitotic sau specializări celulare de suprafață ca *cili*, *flageli*, *microvili*; *b*) *ribozomii* ce fac parte din aparatul complex implicat în sinteza de proteine, adică traducerea transcriptelor genomului; *c*) *depozite de rezerve metabolice:* granule de glicogen sau picături de lipide (în special triacilglicerol și esteri ai colesterolului).

În citosol se desfășoară sinteza de aminoacizi, acizi grași și glicerol, monozaharide, ca și metabolismul intermediar în care acestea sînt implicate.

2.5.1. CITOSCHELETUL

Citoscheletul și citosolul nu trebuie privite ca entități matriceale izolate și rigid constituite, ci, dimpotrivă, ca fiind fluctuante, labile, aflate în permanent schimb de molecule proteice.

Cu toate că numărul tipurilor de proteine din matricea citoplasmatică variază foarte mult de la o specie de celule la alta (exemplu: citoplasma ovocitului de *Xenopus* posedă circa 100 de proteine, iar în citoplasma hepatocitului uman există aproximativ 1 350 de tipuri diferite de proteine), majoritatea masei proteinelor, în toate speciile de celule, este reprezentată de 6 tipuri de proteine, și anume: *actină*, *alfa- și beta-tubuline*, *proteinele filamentelor intermediare*, *clatrina* (proteina veziculelor acoperite), *spasmina* (proteină ce se contractă în prezența calciului) și *calmodulina* (proteină cu afinitate pentru calciu). Proteinele majoritare formează citoscheletul matricei, care cuprinde o rețea principală, alcătuită din grupe de filamente de actină, microtubuli și/sau filamente intermediare și o rețea microtrabeculară de legătură între ochiurile rețelei principale. Actina, alfa- și beta-tubulinele, precum și proteinele filamentelor intermediare se pot afla fie sub formă de subunități polipeptidice în citosol, fie sub formă de agregate macromoleculare foarte riguros așezate, sub formă de microfilamente de actină, în filamente intermediare, sau în microtubuli, constituind citoscheletul matricei celulare.

Microtubulii. Microtubilii sînt structuri lungi, cilindrice, care măsoară aproximativ 25 nm în diametru. Peretele lor este constituit din 13 protofilamente paralele, fiecare format prin polimerizarea unor unități heterodimerice, produse prin interacțiunea a două proteine (G.M. = 55 000) numite *tubulina a* (alfa) și *tubulina b* (beta). Microtubulii se depolimerizează la presiune înaltă sau temperatură joasă în heterodimeri. Polimerizarea heterodimerilor în microtubuli cere concentrații scăzute de Ca^{2+} și este facilitată de un număr de alte proteine, printre care cîteva cu greutate moleculară mare, numite *proteinele asociate microtubulilor*, care se separă împreună cu tubulinele în aceeași fracțiune.

Celulele folosesc microtubulii pentru o varietate de scopuri: *a*) pentru a obține și a menține forme diferite de cea globulară. Prelungiri celulare lungi, ca dendritele și axonii celulelor nervoase, pot exista ca atare numai pentru că sînt susținute în interior de numeroși microtubuli; *b*) pentru a construi

Scanned with OKEN Scanner

un sistem de linii conducătoare, de-a lungul cărora se mișcă diferite componente subcelulare. Această funcție este evidentă în melanocite, în care granulele de pigment se mișcă de la centrul celulei către periferia ei și înapoi, de-a lungul unor asemenea linii. În afară de stabilizarea formei, microtubulii axonilor îndeplinesc o funcție similară și ghidează transportul diferitelor componente de la corpul celulei la terminațiile axonului. *c*) Construiesc fusul mitotic. *d*) Se asociază formînd axul cililor sau flagelilor. În multe celule, microtubulii radiază de la un grup de mase mici, dense, de natură chimică puțin cunoscută, localizate în jurul centriolilor și numite *sateliți centriolari*. Felul în care se termină la periferie nu este bine cunoscut, dar se acceptă faptul că ei interacționează strîns cu citoscheletul membranei celulare.

Microtubulii se află în echilibru cu un fond de heterodimeri solubili, care își pierd capacitatea de a polimeriza, cînd sînt expuși anumitor alcaloizi ca vinblastina, colchicina, podofilotoxina. Rezultatul este depolimerizarea progresivă a tuturor microtubulilor celulei, cu o singură excepție, și anume microtubulii cililor și flagelilor. Cel mai evident efect al acestor alcaloizi este dezorganizarea fusului mitotic și oprirea în metafază a celulelor ce se divid prin mitoză.

Filamentele intermediare. Alte ansambluri macromoleculare ce funcționează ca elemente citoscheletale sînt filamente, cu diametrul de aproximativ 10 nm, grupate în fascicule și numite filamente intermediare, deoarece sînt mai subțiri decît microtubulii și mai groase decît microfilamentele de actină. Ele sînt rezultatul polimerizării a una sau două proteine cu G.M. 50 000—60 000, a căror natură variază de la un grup de tipuri celulare la altul, avînd caracteristici imunologice și biochimice diferite. În funcție de aceste caracteristici se pot distinge cinci tipuri de filamente intermediare: *a*) în celulele epiteliale filamentele intermediare sînt formate din proteine asemănătoare keratinei din păr și unghii, numite *citokeratine*; *b*) în celulele de origine mezodermică ele sînt antigenic diferite și din acest motiv li s-a dat un nume diferit — *vimentine**; acest tip de filamente se găsește asociat cu filamentele specifice celulelor respective în astrocite, în celulele Sertoli și în celulele musculare netede; *c*) *desmina* sau *scheletina* formează prin polimerizare filamente tipice pentru majoritatea tipurilor de celule musculare; *d*) neurofilamentele sînt caracteristice celulelor nervoase; *e*) gliofilamentele sînt specifice celulelor nevroglice.

Filamentele intermediare ca vimentina, desmina și gliofilamentele sînt alcătuite dintr-un singur tip de subunități proteice. Vimentina poate coexista în aceleași celule cu alte filamente intermediare, de exemlu cu desmina, în cazul celulelor musculare netede ale mediei vaselor sanguine. Spre deosebire de acestea, filamentele de citokeratine, alcătuite din proteine asemănătoare (dar nu identice) cu alfa-keratinele epidermice, formează o familie complexă care cuprinde mai multe polipeptide diferite. Aceste citokeratine, care prezintă asemănări biochimice și imunologice de diferite grade, se prezintă, în diferite celule epiteliale, în diferite combinații. Un anumit tip de celulă epitelială poate fi caracterizat printr-o asociație specifică a citokeratinelor din interiorul citoplasmei.

În cursul transformării celulare maligne și al dezvoltării tumorilor, specificitatea de tip celular a filamentelor intermediare se păstrează, iar clasifica-

---

* *Vimentum* (lat.) = nuia, rămurică ondulată.

rea tumorilor după tipul lor specific de filamente intermediare a început să fie folosită în clinică pentru diagnosticul histologic.

Ansambluri contractile. Pînă de curînd se admitea că proteine contractile sînt prezente numai în celulele musculare, striate sau netede, dar în ultimii ani s-a stabilit că practic toate celulele conțin un set aproape complet de proteine musculare, ca actina, miozina, alfa-actinina și tropomiozina. Aceste proteine au proprietățile proteinelor musculare obișnuite, deși sînt în multe cazuri produsele unor gene diferite. Ansamblurile lor filamentoase funcționează la fel ca în mușchi, în esență prin alunecarea filamentelor de actină de-a lungul filamentelor de miozină, dar organizarea ansamblurilor contractile este diferită.

Microfilamentele de actină, cu aproximativ 6 nm diametru, formează deseori fascicule ordonate, ancorate pe versantul citoplasmatic al plasmalemei la vîrful microvililor, la nivelul zonulelor *adherentes*, sau în alte regiuni ale plasmalemei fără o diferențiere aparte. Aceste filamente interacționează cu filamente scurte de miozină și cu alte proteine contractile, formînd unități motorii variate ca mărime, conformație și funcție.

În miezul microvililor apar ansambluri în formă de bastonaș, ce reprezintă substratul mișcării acestora. Ansamblurile în formă de văl, ce se găsesc în faldurile plasmalemei, mișcă particulele sau picăturile de lichid în buzunare ale plasmalemei, în timpul fagocitozei sau pinocitozei. Ansamblurile inelare dezvoltate în *citokinesis* produc constricția și în final clivarea corpului celulei în cele două celule-fiice, la sfîrșitul diviziunii celulare. Ansamblurile mari, lamelare din pseudopode sînt implicate în mișcarea corpului celular ca întreg. În multe celule aceste ansambluri contractile sînt tranzitorii. Ele se dezagregă într-un loc pentru a fi reasamblate în altul.

În celulele musculare diferențiate ansamblurile contractile au o localizare permanentă. Concentrația miozinei este mică în celulele nemusculare și de aceea forța generată în timpul contracției este mică. Totuși, din cauza caracterului tranzitoriu al ansamblurilor lor contractile, celulele nemusculare au avantajul că sînt capabile să schimbe locul și direcția mișcării imprimate fiecărei părți a celulei. Celulele musculare diferențiate sînt mai eficiente din punctul de vedere al forței și direcției contracției, dar mai puțin versatile — ele se pot contracta într-o singură direcție, fixă.

Filamentele de actină pot fi legate încrucișat unul de altul, de un număr de proteine cu G.M. mare, care astfel convertesc matricea citoplasmatică într-un gel reversibil. E de așteptat că acest fenomen să intervină în multe funcții celulare, inclusiv motilitatea. Actina este deci o proteină multifuncțională, folosită de celule pentru a stabiliza membrana celulară (în citoscheletul membranei) și pentru mișcarea sau imobilizarea diferitelor părți ale celulei.

Rețeaua microtrabeculară. Un sistem de microtrabecule* ce conectează microfilamentele, microtubulii și practic toate celelalte componente subcelulare a fost descris în citoplasma celulelor animale examinată la microscopul electronic de înalt voltaj (fig. 2.18). Electronii rapizi generați în acest microscop pot penetra secțiuni relativ groase și furniza o imagine tridimensională a unor straturi de citoplasmă cu grosimea de ordinul micrometrilor. Microtrabeculele pot fi expresia fenomenului de gelificare menționat anterior. Unii autori contestă realitatea lor biologică, considerîndu-le un artefact.

---

* *Microtrabeculae* (lat.) = mici bare.

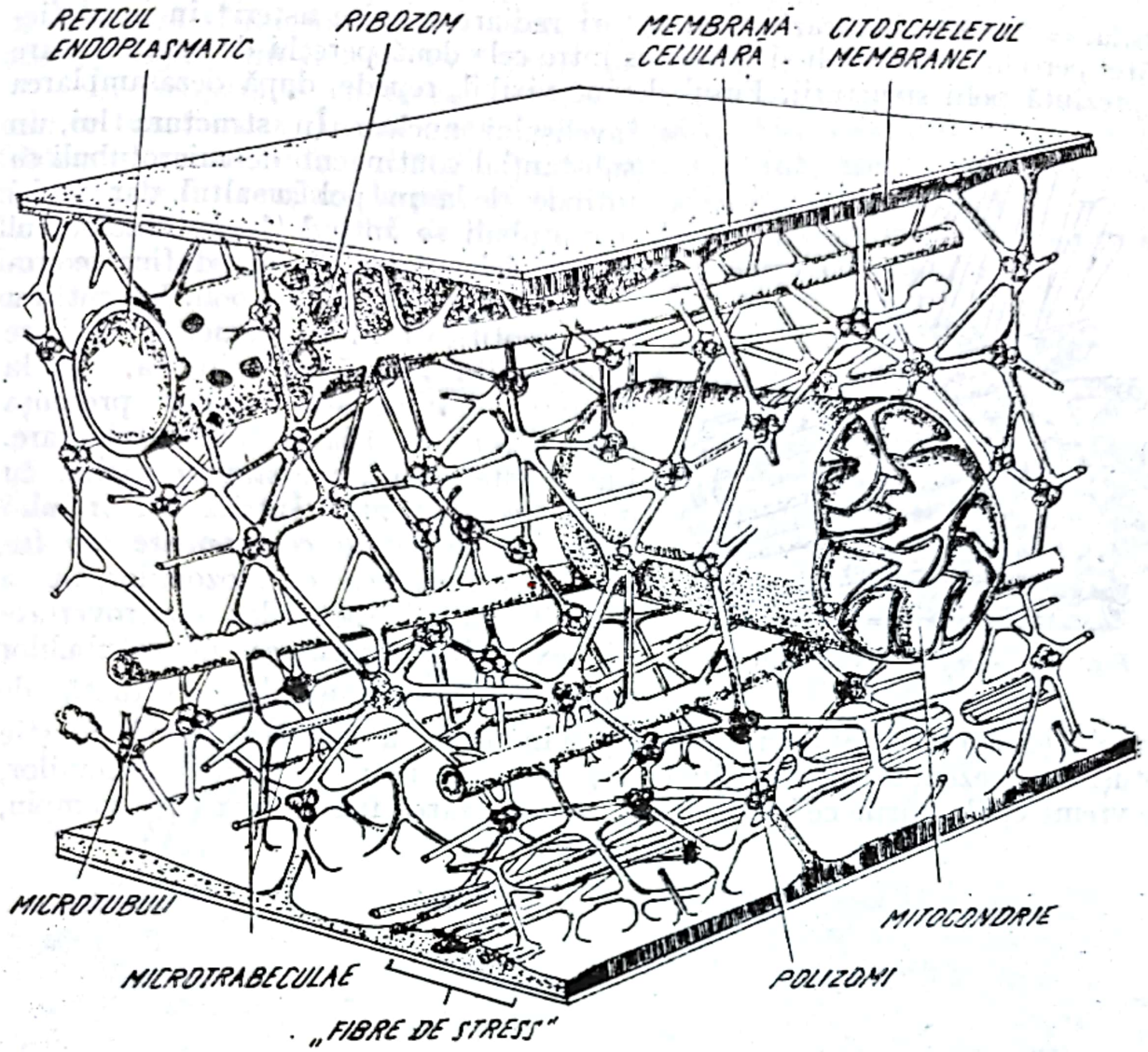


Fig. 2.18. — Matricea citoplasmatică. Reprezentare schematică a rețelei microtrabeculare și a legăturilor ei cu organitele celulare și cu citoscheletul.

2.5.2. CENTRIOLII ȘI FUSUL MITOTIC

Fusul mitotic se formează în citoplasma celulei în mitoză. El constă dintr-un mare număr de microtubili, care, în celulele animale, sînt organizați în jurul unor organite celulare speciale, numite centrioli (fig. 2.19). Centriolul este un corp cilindric (lungime 0,35 μm, diametru 0,15 μm) compus din 9 elemente alungite, dense, dispuse ca paletele unei turbine la periferia cilindrului. Fiecare din aceste elemente este un triplet de microtubuli alipiți. Tripletele sînt legate unul de altul prin conectori periferici și, în același timp, sînt legate de o structură axială printr-un sistem de spițe. Mici mase dense, numite sateliți centriolari, formează un inel discontinuu în jurul centriolului. Microtubulii sînt ancorați de acești sateliți. În timpul interfazei celula are o singură pereche de centrioli, localizați în vecinătatea nucleului, deseori în interiorul zonei Golgi (fig. 2.20 a și b).

Înainte de începutul profazei, centriolii se duplică și fiecare din cele două perechi migrează la polii opuși, de o parte și de alta a nucleului. Microtubulii, produși prin polimerizarea a două proteine solubile numite tubuline

Scanned with OKEN Scanner

(G.M. = 55 000), formează *a*) structuri radiare numite asteri* în jurul fiecărei perechi de centrioli și *b*) un fus între cele două perechi de centrioli care reprezintă polii structurii. Fusul devine vizibil repede după dezasamblarea

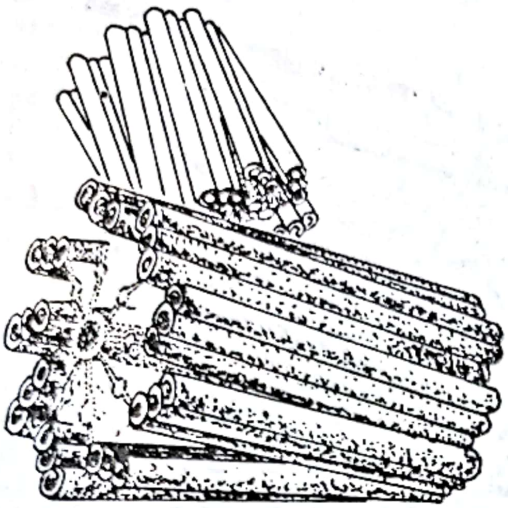


Fig. 2.19. — Schema centriolilor.

învelișului nuclear. În structura lui, un substanțial contingent de microtubuli se întinde de la un pol la altul, dar mulți microtubuli se întind de la cinetocorul cromatidelor la poli, legînd fiecare cromatidă de unul dintre poli. Recent au fost identificate în fus structuri fibrilare formate din actină și miozină, iar la periferia fusului s-a detectat prezența unui înveliș de filamente intermediare. Fusul este deci un aparat complex cu multe componente. Înțelegerea rolului jucat de diferitele componente ale fusului, în mișcarea cromozomilor, nu a depășit stadiul ipotezelor controversate (de exemplu, alunecarea microtubulilor ca în cili, sau mișcarea efectuată de proteinele contractile, microtubulii servind doar ca linii directoare). Se știe totuși că prezența microtubulilor este necesară în mișcarea cromozomilor, de vreme ce drogurile ce interferă cu polimerizarea tubulinelor (de exemplu,

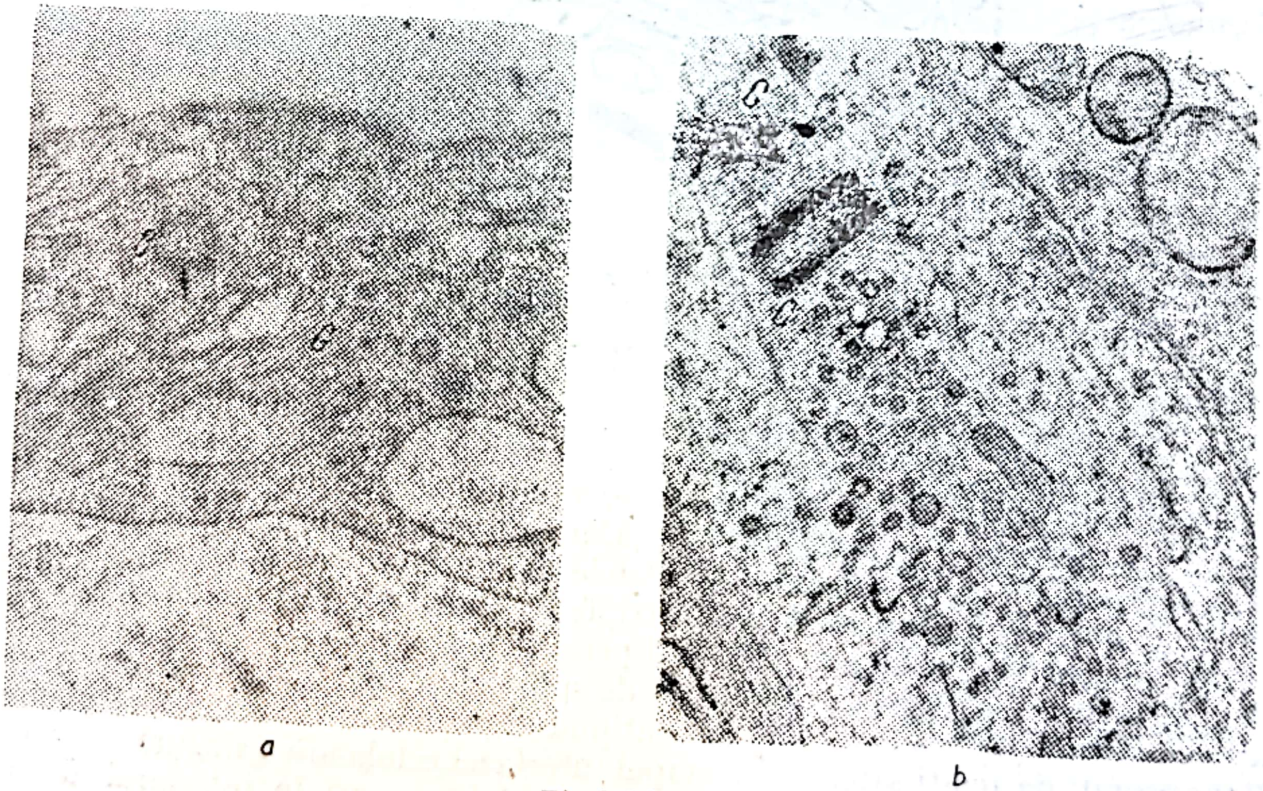


Fig. 2.20. — *a* — Centriol (*c*) în secțiune transversală. *G* — aparat Golgi. Electronomicrografie × 10 000. *b* — Centrioli în secțiune longitudinală. Electronomicrografie × 10 000.

* *Aster* (gr.) = stea.

colchicina, vinblastina, vincristina) împiedică progresarea mitozei dincolo de metafază și duc în ultimă instanță la moartea celulei. Unele dintre aceste droguri sînt folosite în prezent în terapia cancerului.

În comparație cu mecanismele implicate în mișcarea cromozomilor, cele ce funcționează în *citokinesis* sînt destul de bine cunoscute. Un inel de filamente contractile, constînd din actină, miozină, tropomiozină și alfa-actinină, se diferențiază la periferia celulei, de obicei într-un plan perpendicular pe axul lung al fusului de diviziune. Contracția sa progresivă produce la început un șanț de diviziune iar în final, separarea completă a celor două celule-fiice.

2.5.3. CILII. FLAGELUL

Cilul* este o structură lungă, subțire (cu diametrul de aproximativ 0,2 micrometri) care proemină deasupra suprafeței celulare cu 10—20 μm. Este alcătuit dintr-un ansamblu complex de microtubuli, numit *axonemă***, care este învelit de o lungă extensie a membranei celulare și se află în apozi-

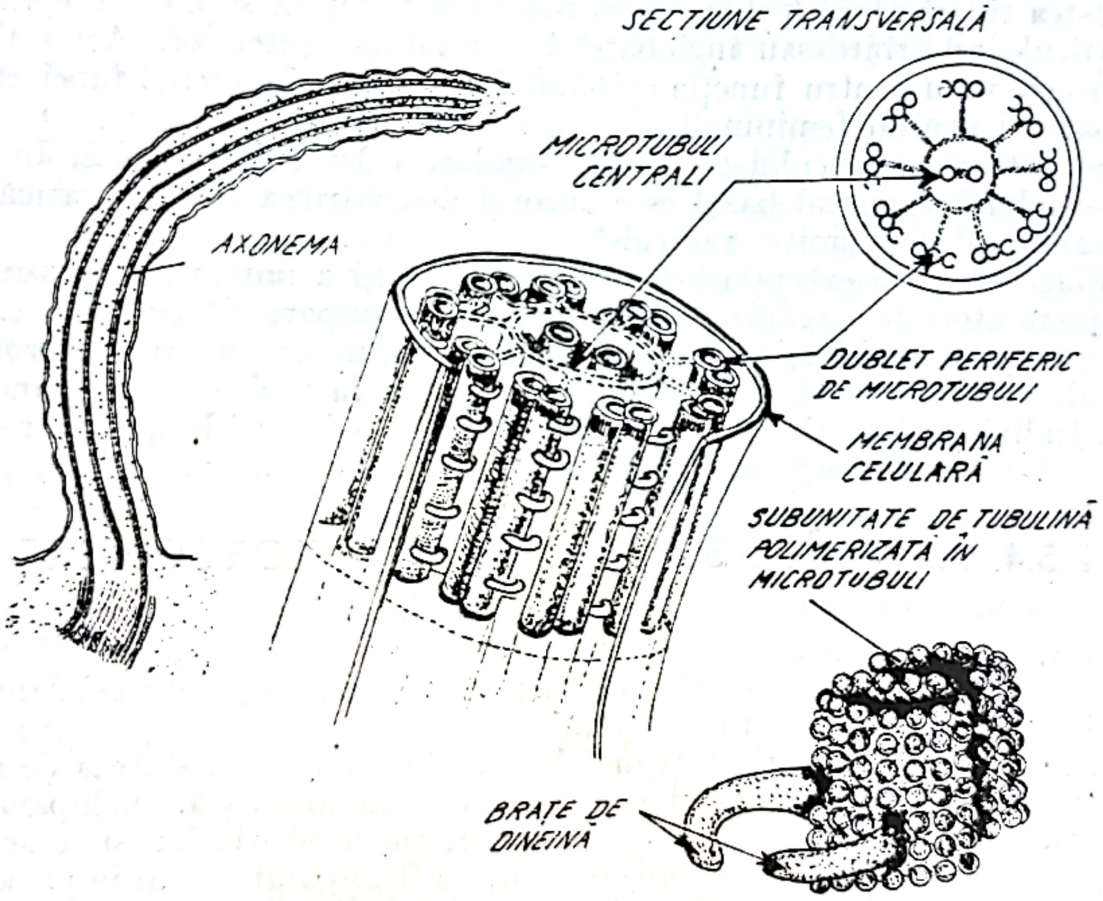


Fig. 2.21. — Schema cilului.

ție cu o structură numită *corpuscul bazal*, așezat aproape de suprafața celulei.

Axonema constă din 9 perechi periferice de microtubuli, dispuse în jurul unei a 10-a perechi, situată central. Acest aranjament (numit tipar 9 + 1) se găsește în toate celulele ciliate și este bine vizibil pe secțiunile transversale ale cililor (fig. 2.21). În fiecare pereche periferică microtubulii fuzionează

* *Cilium* (lat.) = geană.
** *Axonema* (gr.) = filament axial.

de-a lungul lor, formînd un dublet și unul dintre microtubulii dinfiecare dublet este prevăzut cu brațe atașate în unghi drept și la distanțe egale, suficient de lungi pentru a ajunge la dubletul vecin. Spre deosebire de dubletele periferice, perechea centrală constă din doi microtubuli bine separați între ei.

Microtubulii cililor, ca și alți microtubuli, sînt formați din tubuline polimerizate. Brațele lor conțin o proteină cu G.M. mare, cu activitate ATP-azică, numită *dineina*. Dubletele periferice sînt atașate de perechea centrală și de membrana celulară cu ajutorul unui mare număr de proteine care formează un sistem complex de legături. Funcția lor este aceea de a ține împreună elementele variate ale cilului, în timpul mișcărilor lui.

Mecanismul de bază al mișcării cililor amintește de contracția mușchiului striat. El presupune alunecarea dubletelor unul față de altul și se desfășoară prin cicluri succesive de atașare și detașare a brațelor de dineină ale unui dublet, de dubletul vecin. Fiecare ciclu cere energie pusă la dispoziție de către ATP. Nu este bine cunoscut modul în care sînt integrate mișcările de alunecare ale tuturor dubletelor, încît să rezulte mișcarea unitară a cilului. Cilii celulelor epiteliale generează unde, prin mișcările coordonate ale cililor, iar acestea mișcă fluidele (de obicei mucus secretat la suprafața epiteliilor cu particule adsorbite sau înglobate) la suprafața epiteliilor. Acest tip de mișcare este vital pentru funcția epiteliului respirator și epiteliul tubei uterine din aparatul genital feminin.

Structura cospusculului bazal este similară celei a centriolului. În unele tipuri celulare corpuscul bazal este ancorat de matricea citoplasmatică prin structuri fibrilare numite radicule*.

*Flagelul***. Cu excepția lungimii mai mari și a numărului de structuri de susținere asociate, organizarea flagelului este comparabilă cu cea a cilului. La mamifere singura celulă flagelată este gametul masculin (spermatozoidul). Mutațiile care afectează brațele de dineină apar la multe specii, inclusiv la om. Indivizii afectați sînt sterili (masculii) și predispuși la infecții respiratorii repetate, deoarece mișcările cililor și ale flagelilor sînt paralizate.

2.5.4. CITOSOLUL, SEDIU AL MOLECULELOR SOLUBILE

Citosolul conține toate moleculele solubile, inclusiv monomeri solubili — unități constitutive ale macromoleculelor ce formează structuri. Interacțiunile între fondul de molecule solubile și diferitele organite celulare sînt amintite pe parcursul acestui capitol.

În citosol au loc activități metabolice importante ca: sinteza de molecule organice, metabolismul intermediar, glicoliza anaerobă. Echipamentul enzimatic implicat în sinteza aminoacizilor, monozaharidelor și a acizilor grași, în metabolismul și interconversia lor, va fi discutat numai în principiu. Toate aceste enzime sînt considerate a fi solubile, iar reacțiilor lor se presupune că sînt guvernate de o strictă specificitate și de întîlnirea incidentală cu substraturile și modificatorii lor. Chiar la acest nivel, totuși, au evoluat sisteme multienzimatice. Structural ele sînt ansambluri macromoleculare de enzime, care acționează într-o anumită ordine asupra unui substrat și a metaboliților săi succesivi. Un caz bine cunoscut este cel al complexului implicat în sinteza acizilor grași în unele celule eukariote. El constă din 7

---

* *Radicula* (lat.) = rădăcinuță.
** *Flagellum* (lat.) = bici.

enzime și comportă o serie de reacții care au ca rezultat adăugarea cîte unui segment de 2 atomi de carbon la fiecare ciclu. Substraturile rămîn legate de complex pînă cînd produsul final, de obicei un acid gras de 16 atomi de carbon, este eliberat.

Glicoliza, ca proces generator de ATP, va fi abordată la sistemele generatoare de energie în celulă.

2.5.5. DEPOZITAREA DE REZERVE METABOLICE („INCLUZIUNI" CITOPLASMATICE)

2.5.5.1. Glicogenul

În multe celule matricea citoplasmatică conține particule de glicogen care au mărimi variate. Particule mici, compacte, de 25 nm diametru, se găsesc în majoritatea celulelor, mai ales în celulele musculare. Particule mari, cu diametrul de 80 nm, care sînt aglomerări ale particulelor mici menționate, apar în hepatocite.

Glicogenul este o macromoleculă poliglicozidică ramificată în care radicalii de glucoză sînt legați glicozidic alfa 1—4 în lanțul principal și alfa 1—6 la punctele de ramificare. Enzimele care sintetizează și degradează glicogenul (glicogen-sintetaza și, respectiv, fosforilaza), la fel ca și enzimele care reglează sinteza și fosforilaza (proteinkinazele), sînt toate proteine solubile, dar unele dintre acestea interacționează destul de puternic cu particule de glicogen, încît se separă împreună cu ele prin fracționarea celulară.

Sinteza și degradarea glicogenului sînt reglate de un sistem complex care a fost studiat în detaliu în hepatocitele mamiferelor și în celulele musculare. El depinde de variațiile în concentrația glucozei din plasma sanguină. O scădere în această concentrație (hipoglicemia) activează eliberarea glucagonului din celulele alfa ale insulelor pancreatice și de epinefrină din medulosuprarenală. Interacțiunea acestor hormoni cu molecule-receptori specifice din plasmalemă activează o enzimă, adenilaticiclaza, care generează AMP-ciclic (din ATP) în matricea citoplasmatică. AMP-ul ciclic activează o proteinkinază care fosforilează forma inactivă a fosforilazei (fosforilaza B) convertind-o astfel în forma ei activă (fosforilaza A). Enzima activată începe să degradeze (prin fosforoliză) moleculele de glicogen din matricea citoplasmatică. În hepatocite produsul final al fosforolizei — glucozo-6-fosfatul — este defosforilat de către o enzimă integrală a membranei reticulului endoplasmic — glucozo-6-fosfataza. Glucoza astfel produsă părăsește celulele și intră direct în circulație pentru a readuce nivelul glucozei circulante între limitele homeostatice. Concomitent cu activarea fosforilazei, proteinkinaza fosforilează glicogen-sintetaza. În acest caz, însă, enzima fosforilată este inactivă, încît practic toată glucoza generată de degradarea glicogenului poate fi folosită pentru export sau consum intracelular (prin glicoliză), fără să fie în competiție cu sintetaza.

Dacă concentrația glucozei crește peste o anumită limită (hiperglicemie), eliberarea de glucagon și de epinefrină este frînată și au loc o serie de evenimente intracelulare în sens invers (inactivarea fosforilazei, activarea sintetazei de către protein-fosfataze specifice) care duc la reacumularea glicogenului.

Sistemul se bazează deci pe receptori specifici ai hormonilor, pe un mesager de ordinul II obișnuit, AMP-ul ciclic, kinaze specifice și pe efecte contrare ale fosforilării și defosforilării enzimelor în catabolismul și anabolismul glicogenului.

2.5.5.2. Lipidele

Picături de lipide cu mărimi variate (de la 0,2 μm la 5 μm) se găsesc adesea în matricea citoplasmatică. Ele sînt foarte frecvente în celulele care se bazează pe acizii grași pentru nevoile lor energetice, ca și în celulele specializate în metabolismul lipidelor (adipocitele) sau al steroizilor (celulele secretoare de hormoni steroizi). În adipocite, picăturile de lipide ating dimensiuni extreme, pînă la 80 μm. În celulele secretoare de steroizi, picăturile conțin mari cantități de esteri ai colesterolului.

În celulele studiate pînă acum sinteza triacilglicerolilor (din acizii grași și glicerolul generate în matricea citoplasmatică) este îndeplinită de enzime integrale ale membranei RE. Produsul apare în matricea citoplasmatică (dacă celulele îl reține ca rezervă metabolică) sau este segregat în cisternele RE (dacă produsul este destinat exportului, ca lipoproteină), așa cum se întîmplă în hepatocite și enterocite. Enzima care transferă acizii grași din fosfatidilcolină în colesterol, pentru a sintetiza esterii colesterolului, este un component solubil al matricei citoplasmatice și al plasmei sanguine. În majoritatea celulelor picăturile de lipide ale matricei citoplasmatice reprezintă rezerve metabolice care vor fi folosite în producerea de ATP, trecînd prin fosforilarea oxidativă a acizilor grași în mitocondrii.

2.5.6. RIBOZOMII ȘI SINTEZA DE PROTEINE

Sinteza de proteine este neîndoielnic cea mai importantă activitate ce se desfășoară în matricea citoplasmatică a celulelor eucariote. La aceasta participă un mare număr de molecule și ansambluri macromoleculare, dintre care cel mai evident este ribozomul, o particulă de 20—25 nm diametru, cu un coeficient de sedimentare de 80 S.

Ribozomii sînt echipamentul obligatoriu pentru sinteza de proteine, oriunde ar avea loc aceasta. Ca atare, ei apar în celula procariotă ca și în celula eucariotă, iar în aceasta din urmă apar nu numai în matricea citoplasmatică ci și în matricea acelor componente subcelulare, care, ca mitocondriile și cloroplastele, pot să-și sintetizeze cel puțin o pare din proteine. Deși organizați după un plan comun, ribozomii procariotelor și diferite tipuri de ribozomi eucariotici diferă ca mărime și grad de complexitate biochimică. În orice caz, ribozomul constă dintr-o subunitate mare și una mică, ce au fost caracterizate în ceea ce privește moleculele componente, coeficienții de sedimentare, morfologia generală, fiecare subunitate fiind un ansamblu macromolecular de ARN și molecule de proteine (numite respectiv ARNr și proteine r). Ribozomii procariotelor sînt mai mici și mai simpli. Ei au fost studiați mult mai în detaliu decît ribozomii eucariotelor. De fapt, studiile analitice ale ribozomilor eucariotelor au urmat pînă acum direcțiile

Scanned with OKEN Scanner

deja stabilite pentru ribozomii procariotelor. Din acest motiv este utilă prezentarea și compararea informațiilor curente despre ribozomii procariotelor și cei ai eucariotelor (tablul 2.II).

TABELUL 2.II

Ribozomii — parametri de bază

Ribozomi	S	Dimensiuni (în nm)	Masă (în d)	ARNr		Proteine r
				n	S	n
Procariotici	70 S					
subunitatea mică	30 S	15×10×8	0,9×10⁶	1	16 S	21
subunitatea mare	50 S	15×15×10	1,6×10⁶	2	23 S 5 S	34
Eucariotici	80 S					
subunitatea mică	40 S	23×14×11	1,4×10⁶	1	18 S	~30
subunitatea mare	60 S	23×22×17	2,9×10⁶	3	23 S 5,8 S 5 S	~50

S = coeficient de sedimentare
d = daltoni
n = număr
nm = nanometri

2.5.6.1. Ribozomii procariotelor

Constau din două subunități inegale, asimetrice, cu morfologie, compoziție chimică și coeficient de sedimentare caracteristice.

a) *Subunitatea mică*, un corpuscul alungit (15 × 10 × 8 nm), marcat de un șanț asimetric, are un coeficient de sedimentare de 30 S; de aceea este numită *subunitatea 30 S*. Ea constă dintr-o singură moleculă de ARN 16 S și 21 de proteine r. Toate aceste componente proteice au fost izolate (din particulele 30 S din *Escherichia coli*), purificate și stabilită secvența aminoacizilor. Subunități mici funcționale pot fi reconstituite *in vitro*, plecînd de la componentele lor izolate. Structura acestora conține, prin urmare, toată informația necesară pentru propria lor asamblare. În prezent, asamblarea tridimensională a subunității mici este investigată printr-o varietate de mijloace. Scopul ultim este de a înțelege poziția și funcția fiecărei componente, ca și modul în care întregul ansamblu funcționează în timpul sintezei de proteine.

b) *Subunitatea mare* are forma unei bărcuțe (15 × 15 × 10 nm) și un coeficient de sedimentare de 50 S, fiind numită *subunitatea 50 S*. Ea constă din două molecule de ARNr (5 S și 23 S) și aproximativ 30 de proteine r. Cercetări asupra caracterizării și a modului lor de asamblare tridimensională se desfășoară în sensul menționat pentru subunitatea 30 S.

2.5.6.1.1. Etapele sintezei de proteine

2.5.6.1.1.1. *Inițierea*. Cele două subunități ribozomale (fig. 2.22) se asociază ireversibil *in vitro*, la o concentrație a Mg^{2+} de aproximativ 5 mM. *In vivo*,

Scanned with OKEN Scanner

asocierea lor în ribozomi funcționali este controlată de o multitudine de factori, toți direct implicați în sinteza de proteine. Cel mai important dintre aceștia este ARNm prelucrat, ce specifică proteina care trebuie sintetizată. El formează un complex cu o subunitate 30 S liberă și cu un ARNt special ($tARN_f^{Met}$), încărcat cu un radical metionil formilat (fMet $tARN_f$.) Acest ARNt recunoaște codonul de inițiere AUG, localizat aproape de capă-

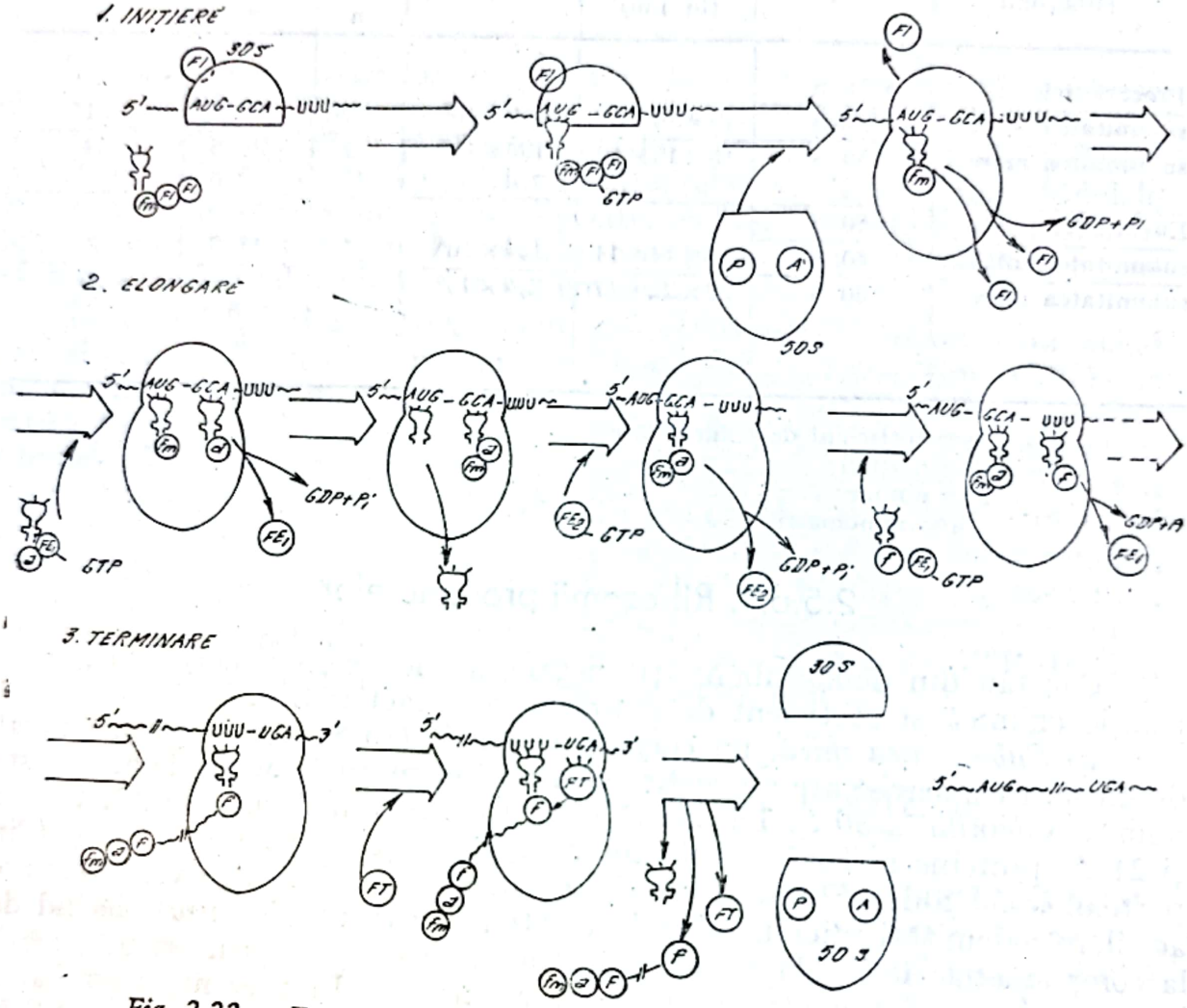


Fig. 2.22. — Etapele sintezei de proteine în ribozomii procariotelor:
FI — factori de inițiere; FE_1 și FE_2 — factori de elongare; *P* — loc peptidil; *A* — loc aminoacil; *f* — formil metionină; *a* — alanina; *f* — fenilalanina; *FT* — factori de terminare.

tul 5' al ARNm. Trei proteine solubile, numite factori de inițiere, și energia rezultată prin scindarea unei molecule de GTP sînt necesare pentru formarea acestui complex, care este acum gata să se asocieze cu subunitatea 50 S formînd un ribozom funcțional. Evenimentele deja menționate constituie etapa de inițiere în sinteza de proteine. $tARN_f^{Met}$ este folosit numai o dată — pentru inițiere — în sinteza fiecărui polipeptid pe ribozomii procariotelor; de aceea este numit ARNt de inițiere.

2.5.6.1.1.2. *Elongarea.* Cînd este format un ribozom funcțional, fMet ARN_f interacționează cu o regiune specială din subunitatea 50 S, de obicei numită loc P (loc peptidil). Lîngă el, pe aceeași subunitate există un alt loc, numit loc A (loc aminoacil) care poate lega orice ARNt încărcat,

dar cel legat în final este ARNt-ul care recunoaște codonul din ARNm ce urmează imediat (în direcția 3') după codonul de inițiere și acesta este acum aliniat cu locul A. În acest stadiu, cînd două ARNt-uri sînt legate de ribozomi, o proteină din subunitatea 50 S funcționînd ca transpeptidază transferă radicalul formil metionil de la ARNt-ul de inițiere (din locul P) la ARNt-ul încărcat din locul A. Rezultatul acestei operații este un dipeptidil ARNt în locul A și un $tARN_f^{Met}$ neîncărcat în locul P. Acesta din urmă este eliberat prompt după ce și-a pierdut radicalul aminoacil. Următorul stadiu implică o operație complexă, numită *translocare*, în timpul căreia complexul ARNm-dipeptidil ARNt și ribozomul se mișcă în direcții opuse pe distanța unui singur codon. Această mișcare deplasează dipeptidil ARNt-ul spre locul P și eliberează locul A, care se aliniază cu codonul ce specifică al treilea radical de aminoacid din secvența polipeptidului. ARNt-ul încărcat specific se leagă de locul A, transpeptidaza realizează o nouă legătură peptidică, urmează translocarea, tripeptidil ARNt este deplasat spre locul P și locul A este făcut liber pentru ARNt-ul încărcat cu următorul aminoacid din secvență. Această serie de reacții, numită elongare, cere participarea a trei proteine solubile (numite factori de elongare) și energia pusă la dispoziție de o moleculă de ATP și una de GTP. Prima este necesară pentru a lega ARNt încărcat de locul A, iar a doua, pentru efectuarea translocației.

2.5.6.1.1.3. *Terminarea.* Seria de interacțiuni implicate în elongare este repetată de n-1 ori, n fiind numărul de radicali de aminoacid din produsul inițial al traducerii, pînă cînd, în final, un codon special UGA (UAA) al ARNm este aliniat în locul A. Acești codoni speciali, numiți codoni de terminare, nu sînt recunoscuți de ARNt speciali, ci de proteine specifice numite factori de terminare. În prezența lor transpeptidaza rupe legătura între ultimul ARNt și lanțul polipeptidic, ultimul este descărcat de pe subunitatea mare, subunitățile disociază de ARNm și disociază una de alta, după care reintră în fondul de subunități ribozomale libere din citosol, de unde pot fi mobilizate pentru traducerea unui alt ARNm. Această serie de reacții constituie ultima etapă, numită terminare, în sinteza de proteine.

2.5.6.1.1.4. *Etape preparatoare.* Reacțiile complexe și numeroase descrise aici sumar reprezintă doar o parte din reacțiile necesare pentru sinteza de proteine. De exemplu, înainte de legarea sa de un ARNt cunoscut, fiecare aminoacid e activat, formînd o anhidridă mixtă cu acidul adenilic. Aceasta este o reacție endergonică, reacție care consumă echivalentul a două legături fosfat macroergice. Rezultă că celulele investesc echivalentul a patru legături fosfat macroergice pentru fiecare legătură peptidică formată în timpul sintezei de proteine: două pentru activarea aminoacidului, una pentru legarea ARNt corespunzător încărcat de locul A și una pentru translocare. Energia primei legături macroergice investite este conservată în aminoacil adenilat și folosită pentru a genera legătura peptidică. Echipamentul necesar pentru a activa aminoacizii și a genera ARNt încărcat e localizat în întregime în citosol. El cuprinde aproximativ 60 de ARNt-uri diferite (mai mult de unul pentru fiecare aminoacid) și un set de aminoacid-ARNt-sintetaze, proteine mari, polimerice, care îndeplinesc în tandem sinteza aminoacil adenilaților și încărcarea ARNt-urilor corespunzătoare.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.6.1.2. Polizomii procariotelor

De obicei ARNm este tradus simultan de un număr de ribozomi corespunzător cu lungimea sa și în acord cu greutatea moleculară a proteinei ce rezultă. Acest complex, numit polizom, conține cîte un ribozom pentru ~ 30 de codoni ai ARNm și, prin urmare, pentru fiecare ~ 3 300 daltoni de produs al traducerii.

Polizomii se văd ca grămezi de ribozomi de diferite mărimi. După izolare ei apar ca lanțuri de ribozomi, în care unitățile ribozomale sînt legate una de alta de un fir fin, cu diametrul de aproximativ 2 nm, considerat a fi ARNm. În ansamblul de polizomi ARNm este localizat între cele două subunități ribozomale și majoritatea interacțiunilor cu ARNt-urile încărcate au loc la nivelul regiunii subunității 50 S, adiacentă subunității 30 S. Poziția exactă a locurilor P și A este încă necunoscută, dar fiecare dintre ele pare să reprezinte un grup de proteine r în interacțiune.

2.5.6.1.2.1. *Poliribozomi liberi și poliribozomi atașați.* La procariote marea majoritate a ribozomilor sînt prezenți ca polizomi. Majoritatea polizomilor sînt liberi în matricea citoplasmatică și implicați în sinteza proteinelor solubile sau proteinelor pentru ansamblurile macromoleculare. Înainte sau puțin după terminare, produsul primar al traducerii de către polizomii liberi este modificat prin îndepărtarea primului aminoacid (și uneori și a celui de al doilea) de la capătul N.

Cîțiva polizomi sînt totuși atașați de plasmalemă. Ei produc proteine secretorii (sau proteine periplasmice) și proteine integrale de membrană pentru plasmalemă sau pentru peretele celular. În acest caz modificările suferite de produsul primar al traducerii sînt mai extinse decît în cazul produselor ribozomilor liberi. Aceste modificări vor fi expuse mai în amănunt în legătură cu polizomii atașați din celula eucariotă.

Sinteza de proteine în procariote este inhibată eficient și puternic de unele antibiotice. Fiecare din ele este specifică pentru o anume reacție din proces și fiecare își exercită efectul prin legarea sa de o anumită proteină ribozomală (tabelul 2.III).

TABELUL 2.III

Antibioticele care influențează sinteza de proteine

Antibiotic	Tipul de ribozom	Ținta	Alte efecte
Streptomicina	procariotic, 30 S	inițierea	citirea greșită a codului
Tetraciclina	procariotic, 30 S	locul A (elongarea)	
Cloramfenicolul	procariotic, 50 S	peptidiltransferaza	
Eritromicina	procariotic, 50 S	translocarea	
Cicloheximida	eucariotic, 60 S	peptidiltransferaza	
Puromicina	procariotic, 50 S	locul A	terminare prematură
	eucariotic, 60 S	locul A	

Scanned with OKEN Scanner

Puromicina acționează ca analog al aminoacil-ARNt. Ea se leagă de locul A și participă la formarea legăturii peptidice, dar peptidil puromicina astfel formată este eliberată, în loc să fie translocată.

Penicilina nu afectează sinteza de proteine ci sinteza peretelui celular al bacteriilor.

De vreme ce majoritatea antibioticelor sînt produse de fungi sau bacterii din sol, se acceptă că ele reprezintă substanțe folosite în războiul chimic natural între microorganismele din sol.

2.5.6.2. Ribozomii eucariotelor

Ribozomii din matricea citoplasmatică a celulelor eucariote sînt construiți după același plan general ca și cei din procariote, dar ei constau din molecule mai mari și mai numeroase de ARNr și proteine r.

Rezultă că ei sînt mai mari, mai complicați, mai greu de analizat, totuși alcătuirea lor generală este foarte asemănătoare cu cea a ribozomilor din celulele procariote, iar modul în care funcționează este, în esență, același.

a) *Subunitatea mică* măsoară 23 × 14 × 11 nm, are un coeficient de sedimentare de 40 S și constă dintr-un ARNr de 18 S și 30 proteine r.

b) *Subunitatea mare* are un coeficient de sedimentare de 60 S. Această particulă, alcătuită din 3 molecule de ARNr (5 S; 5,8 S; 23 S) și 50 de proteine r, măsoară 23 × 22 × 17 nm.

2.5.6.2.1. Sinteza de proteine pe ribozomii eucariotelor

Sinteza de proteine pe ribozomii eucariotelor se desfășoară de-a lungul acelorași etape, adică inițiere, elongare, terminare, ca și în procariote. Codonul de inițiere este același, AUG, dar ARNt de inițiere diferă: anticodonul său este complementul lui AUG, ca și în procariote, dar radicalul aminoacil pe care-l poartă este metionina nemodificată.

Factorii de inițiere, elongare, terminare diferă în eucariote de cei din procariote, dar reacțiile la care participă sînt similare (fig. 2.23). Nevoile de energie sînt aceleași. Dată fiind existența unui compartiment nuclear separat, în care are loc transcripția, ARNm-urile eucariote trebuie sintetizate și transportate în citoplasmă, înainte ca traducerea lor să înceapă. În acest sens, situația este clar diferită de cea din procariote, în care traducerea unui anumit ARNm începe la capătul 5′, în timp ce transcripția continuă către capătul 3′. Separarea transcripției de traducere face posibilă prelucrarea intensă a ARNm-urilor de către eucariote. În contrast cu omologii lor procariotici, ARNm-urile eucariotelor nu sînt copii directe ale genelor, ci exemplare intens prelucrate, din care secvențe cu lungime variabilă sînt eliminate, iar secvențele rămase sînt îmbinate cap la cap. ARNm-urile ajung în matricea citoplasmatică ca particule ribonucleoproteice, care sînt dezasamblate înainte de inițierea traducerii. Secvența poliadenilică (poli A) pe care o au la capătul 3′ devine din ce în ce mai scurtă, pe măsură ce se desfășoară cicluri repetate de traducere; acesta este motivul pentru care se crede că ea controlează ritmul *turn-over*-ului ARNm-urilor.

Deși ribozomii pot fi considerați unelte biologice fundamentale și ubicuitare, există o omologie foarte limitată între componentele ribozomilor eucariotici și procariotici cum ar fi proteinele r. Este totuși semnificativ

faptul că cele cîteva omologii stabilite pînă acum aparțin proteinelor r implicate în reacții critice, de exemplu legarea ARNt-urilor încărcate. Această lipsă de conservare în evoluție are mare importanță practică în medicină. Majoritatea antibioticelor care inhibă sinteza de proteine pe ribozomii procariotelor nu afectează sinteza de proteine pe ribozomii citoplasmatici ai euca-

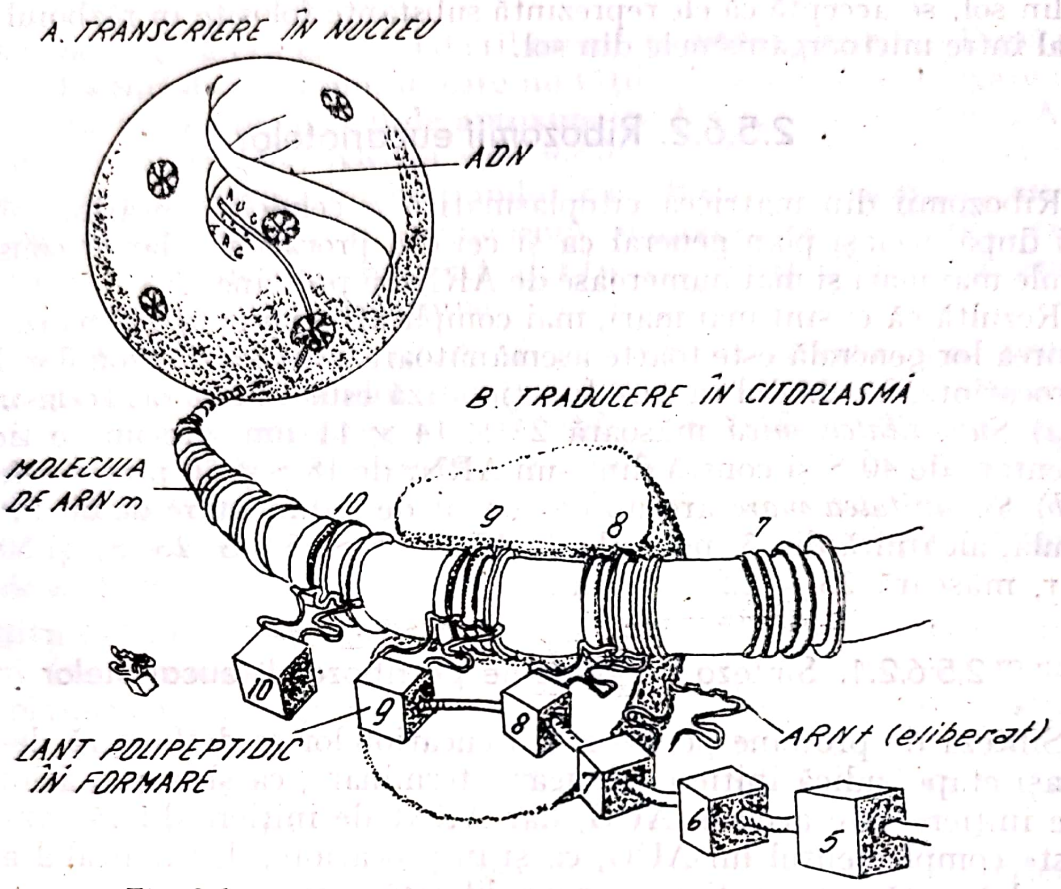


Fig. 2.23. — Sinteza de proteine în celula eucariotă.

riotelor și vice-versa, pe aceasta bazîndu-se folosirea lor eficientă în tratamentul bolilor infecțioase.

2.5.6.2.2. Polizomii eucariotici

Ca și în celulele procariote, marea majoritate a particulelor ribozomale în eucariote se găsesc asamblate tot timpul în polizomi și numai o mică parte aparține unui fond de subunități disociate libere. Există două clase distincte de polizomi, și anume: polizomii liberi care sînt răspîndiți incidental în matricea citoplasmatică și polizomii atașați de membrana reticulului endoplasmic, aceasta fiind singurul tip de membrană din celula eucariotă de care ribozomii sînt capabili să se atașeze. Deci, în contrast cu situația întîlnită la procariote, nu s-au observat ribozomi legați de plasmalemă. Trebuie notat faptul că deși atașați de membrana reticulului endoplasmatic, polizomii legați, ca și polizomii liberi, sînt înconjurați de matricea citoplasmatică.

Polizomii atașați formează un număr mic de tipare caracteristice pe versantul citoplasmatic al membranei RE, cele mai obișnuite dintre ele fiind bucle, cercuri, rozete, spirale, șiruri duble, la care iau parte un număr variabil de ribozomi. În anumite tipuri celulare predomină un singur tipar (de exem-

plu, spirale în plasmocite, șiruri duble în fibroblaști), în alte tipuri celulare se găsește un amestec variat de tipare polizomale.

Numărul total al populației de ribozomi dintr-o celulă eucariotă este în legătură directă cu producția sa de proteine (deseori poate să atingă 1×10^6 unități).

Polizomii liberi sintetizează proteine destinate să funcționeze intracelular. Printre ele sînt proteine solubile pentru citosol, unități monomerice pentru ansamblurile de proteine ale aparatului locomotor al celulei și proteinele destinate transportului spre anumite compartimente intracelulare — de exemplu mitocondriile —, unde vor deveni fie proteine ale membranei mitocondriale, fie ale matricei mitocondriale. Ribozomii liberi reprezintă majoritatea populației ribozomale în celulele nediferențiate, ce cresc rapid, și în celulele diferențiate (sau în curs de diferențiere), a căror funcție necesită o mare cantitate de proteine matriceale, cum ar fi mioblaștii și precursorii eritrocitelor. În asemenea celule ribozomii atașați constituie o mică minoritate a populației ribozomilor.

Polizomii atașați sintetizează proteine pentru secreția „deschisă", adică pentru export în compartimentul extracelular ca și proteine pentru uz intracelular, ca enzimele lizozomale (secreția „acoperită"). Ei sintetizează de asemenea proteinele integrale ale membranei celulare. Deoarece proteinele de export sînt produse într-un ritm mult mai rapid decît proteinele pentru uz intracelular, fracțiunea de polizomi atașați din populația ribozomală totală reflectă în primul rînd producția de proteine de secreție a celulei. Aceasta atinge cele mai mari valori în celulele exocrine sau endocrine, exemple evidente fiind hepatocitele, plasmocitele, celulele acinilor pancreatici și ale glandelor salivare. Toate aceste celule au, totuși, o subpopulație minoritară de polizomi liberi, cum este de așteptat datorită funcțiilor acestui tip de polizomi, enumerate mai sus.

Subunitățile ribozomale sînt interșanjabile și toți polizomii — liberi sau atașați — sînt asamblați din subunități libere de 40 S și 60 S, mobilizate din fondul comun localizat în citosol. Celulele au posibilitatea să-și recicleze ribozomii din starea liberă în cea atașată și vice-versa, în concordanță cu necesitățile lor, sau conform programului lor inerent de dezvoltare. De exemplu, o celulă exocrină își începe procesul de diferențiere avînd o populație de polizomi în care predomină cei liberi, necesari pentru a-i susține creșterea și proliferarea, ca și asamblarea echipamentului celular cerut de viitoarele sale activități. La sfîrșitul procesului, cînd celula se angajează în producerea la capacitatea maximă de proteine secretorii, predomină polizomii atașați.

Prelucrarea polipeptidelor produse de ribozomii liberi este limitată, în majoritatea cazurilor, la îndepărtarea radicalului metionil de la capătul N terminal inițial. Prelucrarea este mult mai complexă în cazul polizomilor atașați, unde este legată de translocarea completă sau parțială a polipeptidelor nou sintetizate prin membrana reticulului endoplasmatic. Detaliile acestui proces vor fi expuse în contextul funcțiilor reticulului endoplasmic.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.7. RETICULUL ENDOPLASMATIC

2.5.7.1. Morfologie generală

Așa cum s-a mai afirmat, celulele eucariote sînt sisteme înalt compartimentate. Printre multele lor compartimente intracelulare cel mai complex ca formă tridimensională și cel mai divers ca funcție este reticulul endoplasmic (RE), o rețea de canale mărginite de membrană, care se extinde în toată citoplasma între nucleu și plasmalemă. Aceasta formează în jurul nucleului cisterna perinucleară sau învelișul nuclear. Întinderea sa se limitează la partea internă, mai fluidă a citoplasmei, numită *endoplasmă*, de unde numele de reticul endoplasmic. El rămîne de obicei separat de plasmalemă printr-un strat subțire al citoplasmei, desemnat ca exoplasmă, ce conține infrastructuri fibrilare, desemnate ca citoscheletul membranei celulare. Contactul sau continuitatea membranei reticulului endoplasmic cu plasmalema este extrem de rar și poate fi chiar considerat accidental (artefacte datorită preparării?).

Rețeaua de canalicule este limitată de o membrană subțire (aproximativ 6 nm), care separă conținutul lor de matricea citoplasmatică. Este alcătuită din canalicule (tubuli) cu diametrul de aproximativ 50 nm, deseori încolăcite și anastomozate, și din saci turtiți sau cisterne cu o adîncime de 50—70 nm, iar cu celelalte două dimensiuni, de ordinul a 10 μm. Cînd sînt numeroase, cisternele tind să se dispună paralel, în pachete, dispoziție care adesea maschează existența rețelei, aceasta fiind mai evidentă în părțile canaliculare ale sistemului. Datorită faptului că frecvent predomină cisternele, spațiul delimitat de membrana RE și conținutul său sînt denumite spațiu cisternal sau conținut cisternal (acești termeni se extind și la alte compartimente). Cînd spațiul cisternal este mărit prin acumularea de produse celulare, geometria reticulară a sistemului devine mult mai evidentă (pe preparatele secționate seriat). Este probabil ca spațiul cisternal să se continue pe toată lungimea întregului RE, supoziție însă greu de dovedit: ar fi necesară o reconstrucție tridimensională bazată pe 300—400 de secțiuni seriate. Forma sistemului este labilă. În condiții anormale, inclusiv în cazul lezării plasmalemei, canaliculele și cisternele RE se dilată și se rup, rezultînd vezicule separate, sferice, cu diametrul de 50—100 nm. Procedeul fracționării celulare beneficiază de acest fenomen. Veziculele RE se produc *in situ* cînd plasmalema este ruptă de forțele de forfecare folosite pentru omogenizarea țesuturilor sau celulelor. Aceste vezicule pot fi separate de alte componente subcelulare ca o fracțiune celulară distinctă, numită *fracțiunea microzomală*, printr-o varietate de procedee de centrifugare. Veziculele fracțiunii se numesc *microzomi*. Separarea este totuși imperfectă și incompletă așa încît nu toți microzomii reprezintă vezicule derivate de RE și nu toate veziculele derivate din RE se regăsesc în fracțiunea microzomală.

Diferențieri locale. O caracteristică remarcabilă a reticulului endoplasmic este asocierea sa locală cu alte componente subcelulare sau organite celulare. Aceasta generează domenii diferențiate structural și funcțional în cadrul sistemului, dintre care cel mai bine studiate sînt următoarele:

— *Cisterna perinucleară sau învelișul nuclear* ce înconjură nucleul în timpul interfazei și controlează traficul către și de la nucleu prin porii nucleari.

— *Reticulul endoplasmic rugos (RER)*, caracterizat prin asocierea sa cu polizomii atașați. Este acea parte din rețea în care predomină elementele mari cisternale (fig. 2.24 a și b).

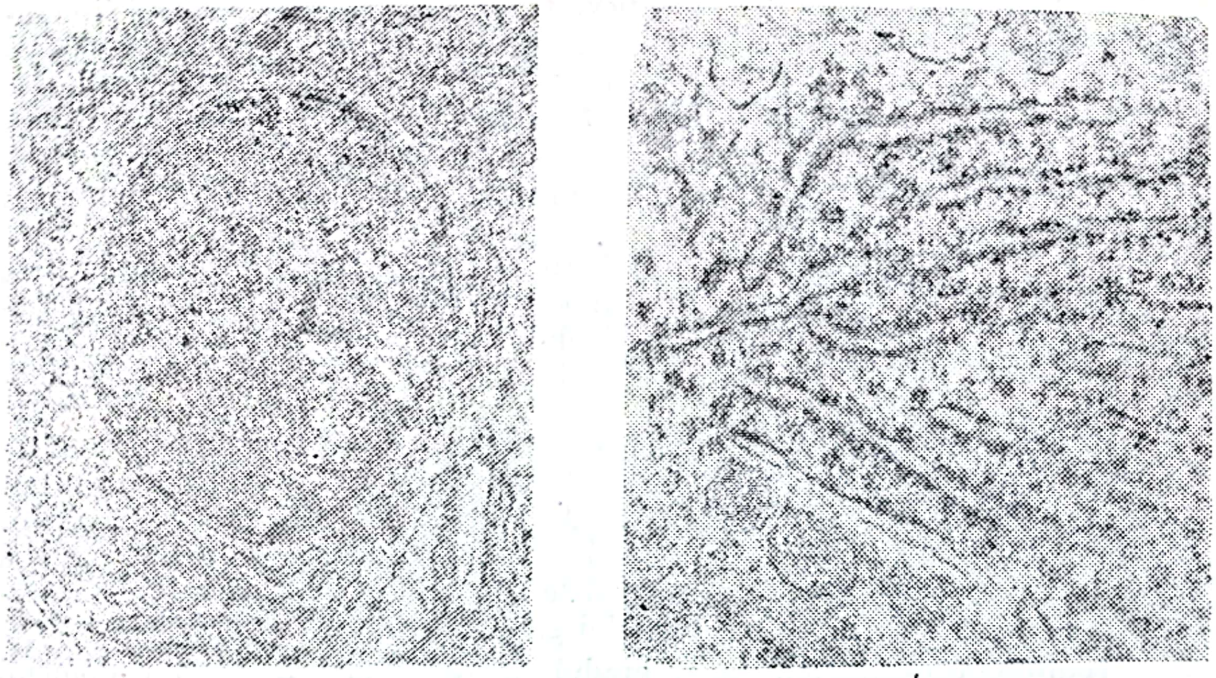


Fig. 2.24. —
a — Reticul endoplasmic rugos. Electronomicrografie × 4 200. *b* — Reticul endoplasmic rugos Electronomicrografie × 10 000.

— *Reticulul endoplasmic neted (REN)* este acea parte a sistemului fără ribozomi atașați (fig. 2.25), alcătuită din canalicule fine, organizate într-o rețea strînsă. Este asociat în unele tipuri de celule cu depozite de glicogen, dar aceasta nu constituie o regulă.

Fig. 2.25. — Reticul endoplasmic neted. Celulă secretoare de steroizi. *L* — picătură lipidică. Electronomicrografie × 5 500.

— În unele celule, în special la nevertebrate, o parte din RE este diferențiat în dispozitive de cisterne fenestrate, ce amintesc ca organizare învelișul nuclear, dar localizate în pachete, în citoplasmă. Ele se numesc *lamellae annulatae*, iar semnificația lor funcțională este încă necunoscută. Prezintă interes apariția lor frecventă în celulele canceroase la mamifere, inclusiv la om.

— *Elementele tranziționale* la granița între RE și complexul Golgi vor fi descrise la aparatul Golgi.

Aceste diferențieri locale apar în toate celulele eucariote animale. În plus, în anumite tipuri celulare au evoluat modificări speciale, importante funcțional. Cel mai izbitor exemplu este reticulul sarcoplasmic — o structură complexă, asociată cu sarcomerele miofibrilelor în mușchiul striat scheletic și cardiac.

Reticulul endoplasmatic rugos este foarte bine dezvoltat în celulele ce produc proteine de secreție. Reticulul endoplasmatic neted este dezvoltat în celulele specializate în metabolismul lipidelor, mai ales al colesterolului. El atinge dezvoltarea maximă în celulele ce produc sau catabolizează steroizi și hormoni steroidici, de exemplu celulele corticosuprarenalei, celulele interstițiale ale testiculului, celulele corpului galben din ovar, hepatocitele.

Indiferent de varietatea și gradul de dezvoltare a acestor domenii diferențiate, ele sînt întotdeauna în continuitate unul cu altul. Membrana lor — comună, continuă — înconjură un spațiu continuu comun, așa cum arată microscopia electronică pe secțiunile favorabile și cum demonstrează trasorii fiziologici — proteine cu activitate enzimatică detectabile *in situ* prin procedee citochimice.

2.5.7.2. Componența moleculară și funcțiile reticulului endoplasmatic

2.5.7.2.1. Fracțiunile microzomale

Fracțiunile microzomale au fost mult folosite pentru a culege informații asupra biochimiei și funcției reticulului endoplasmic. De reținut că majoritatea acestor informații au fost obținute din fracțiunile de ficat. Rămîne de elucidat în ce măsură datele obținute sînt aplicabile în general. Fracțiunea obținută inițial prin centrifugare diferențială s-a dovedit a fi foarte eterogenă: conținea, în afară de vezicule cu originea RE, vezicule derivate din complexul Golgi, plasmalemă și membrana mitocondrială externă. Demonstrarea domeniilor diferențiate în RE a stimulat încercările de a le separa. Variante îmbunătățite de fracționare celulară au dus la separarea unei fracțiuni de înveliș nuclear, a unei fracțiuni ce conține complex Golgi și la separarea veziculelor cu originea în RER de veziculele derivate din REN. În prezent, se pot obține fracțiuni microzomale derivate din RER și fracțiuni Golgi suficient de omogene. Fracțiunea microzomală derivată din REN este însă contaminată de vezicule plasmalemale, elemente Golgi și membrane mitocondriale externe.

2.5.7.2.1.1. *Lipidele* din fracțiunile microzomale derivă în primul rînd din lipidele polare ale bistratului membranei RE. E posibilă și o oarecare contaminare de la conținutul lipidic, în hepatocite și enterocite. Fracțiunea, probabil membrana RE, este neobișnuit de bogată în fosfatidilcolină și în

Scanned with OKEN Scanner

alte fosfolipide și relativ săracă în sfingomielină și, mai ales, în colesterol. Totuși, colesterolul nu pare a fi un contaminant provenit din alte membrane, de vreme ce enzimele etapelor terminale în sinteza colesterolului sînt localizate în membrana RE, iar produsul lor este de așteptat să separe, în parte, în bistratul membranei RE.

Radicalii de acizi grași ai fosfolipidelor sînt de mărime medie și înalt nesaturați. Astfel, compoziția lipidelor este compatibilă cu o membrană înalt permeabilă și extrem de fluidă. De fapt, după ce sînt izolate, veziculele microzomale se arată a fi permeabile la molecule cu greutatea moleculară $= 5\,000$, iar răspunsul lor la schimbări în osmolaritatea mediului este limitat. Ele sînt totuși impermeabile la proteine cu G.M. $> 20\,000$ și deci la majoritatea proteazelor.

2.5.7.2.1.2. *Proteinele.* Proteinele fracțiunii microzomale pot fi împărțite în proteine de membrană și proteine ale conținutului. În plus, o cantitate relativ mare de proteine solubile este adsorbită la suprafața externă a veziculelor microzomale, mai ales în microzomii derivați din RER. Separarea proteinelor de membrană de proteinele din conținut este încă imperfectă. Fracțiunile includ proteinele membranare și proteinele de secreție, în diferite stadii de prelucrare, ca și proteine care rămîn în spațiul cisternal, unde acționează ca modificatori post-traducere ai proteinelor de secreție. Proteinele de membrană sînt numeroase, variate ca mărime și ca funcție. La gradul de rezoluție atins de electroforeza în gel unidimensională, pot fi recunoscute aproximativ 50 de benzi. Numărul de benzi și deci de proteine separabile va crește probabil o dată cu îmbunătățirea rezoluției.

Majoritatea informațiilor despre proteinele membranei RE au fost obținute prin metode citoenzimologice, cu care s-au identificat un mare număr de activități enzimatice, localizate aici. Unele enzime au fost izolate și purificate. Membrana RE este în prezent membrana cu cel mai mare număr de componente caracterizate. În sfîrșit, în unele cazuri, informația obținută prin metode citoenzimologice a fost corelată cu informația obținută prin electroforeză. Ca rezultat al acestei diversități de metode de studiu, au putut fi localizate în membranele RE unele procese biochimice importante, pe care le vom prezenta în cele ce urmează.

1. *Enzime implicate în metabolismul lipidelor* intervin în:

• *Sinteza triacilglicerolilor din acizi grași și glicerol, ambele produse în matricea citoplasmatică, avînd ca intermediari glicerolfosfatul și acidul fosfatidic.* Produsele apar fie în spațiul cisternal, unde devin o parte din particulele lipoproteice produse pentru export, fie în matricea citoplasmatică, unde sînt depozitate sub formă de picături de lipide, ca rezervă metabolică.

• *Sinteza fosfolipidelor din acid fosfatidic și colină, serină, etanolamină sau inozitol (activate).* Celulele au două opțiuni în acest proces: prima este sinteza *de novo*, pe toată calea de la fosfatidilserină la fosfatidiletanolamină (prin decarboxilare) și fosfatidilcolină (prin metilare succesivă); a doua este recuperarea colinei din componentele catabolizate, activarea ei la fosfatidilcolină și legarea de acidul fosfatidic.

Echipamentul enzimatic necesar pentru a produce aceste componente importante ale bistratului lipidic al tuturor membranelor celulei este localizat exclusiv în membrana RE. Acest monopol virtual implică existența de sisteme de transport al fosfolipidelor de la RE la toate celelalte membrane. Cîteva componente potențiale ale sistemului au fost identificate și caracterizate. Ele

Scanned with OKEN Scanner

funcționează *in vitro* ca proteine de conversie pentru fosfolipide variate. Activitatea lor *in vivo* este încă incertă. Ele ar putea face parte dintr-un sistem mai complicat, capabil să efectueze transferul net de fosfolipide.

• *Sinteza sfingolipidelor și parțial sinteza sfingoglicolipidelor.*

• *Sinteza colesterolului.* În acest caz, în membrana reticulului endoplasmic sînt localizate numai o enzimă-cheie, 3-hidroxi-3-metil glutaril CoA și un lanț de enzime terminale, responsabile de convertirea squalenului în lanosterol și a acestuia, în final, în colesterol. Trebuie notat că monopolul RE se aplică practic tuturor lipidelor polare ce se găsesc în toate bistraturile. Deci, sisteme de transport trebuie să funcționeze pentru toate aceste lipide.

• *Interconversia lipidelor prin enzime modificatoare ce operează la diferite niveluri:*

a) Transacilaze care remaniază compoziția în acizi grași a fosfolipidelor și reacilează lizofosfatidele.

b) Enzime care lungesc moleculele de acizi grași.

c) Un sistem enzimatic care desaturează acizii grași. Acest sistem este un lanț de trei enzime: NADH-citrocrom-b_5-reductaza, citocromul-b_5 și desaturaza, toate proteine membranare integrale ale RE. Primele două au fost izolate, purificate și caracterizate. Ele au un domeniu hidrofil mare, ce proemină în matricea citoplasmatică, și un domeniu hidrofob mai mic, cufundat în bistrat. Desaturaza este mai hidrofobă și deci mai adînc cufundată în bistratul lipidic. Sistemul funcționează cu un lanț transportor de electroni de la NADH și acizii grași la O_2. El este inductibil, în sensul că enzima-cheie — desaturaza — are o viață scurtă, iar cantitatea produsă poate fi continuu adaptată la nevoile celulei. Așa cum s-a menționat, celulele mențin fluiditatea bistraturilor membranelor lor la temperatura ambiantă. Pentru a îndeplini acest scop ele ajustează continuu gradul de nesaturare a fosfolipidelor din bistrat. Enzime ce modifică lipidele sînt prezente în toate membranele celulare, dar pentru cîteva din ele concentrația și cantitatea absolută sînt cele mai mari în RE.

2. *Enzime de transport.* Pentru a localiza un număr de fosfataze în RE sau în membrana RE, au fost folosite metode biochimice și teste citochimice. Iată cîteva exemple de asemenea fosfataze:

• *ATP-aza de Ca^{2+} prezentă ca proteină majoritară în membrana reticulului sarcoplasmic.* Activități comparabile, dar mai mici, au fost înregistrate în neuroni și în alte celule. Enzima face parte dintr-un sistem homeostatic care menține activitatea Ca^{2+} sau concentrația lui ionică la un nivel scăzut în citosol (10^{-6} M) prin pomparea Ca^{2+} în spațiul cisternal al RE, unde acest ion este sechestrat de o altă proteină. Celulele musculare folosesc variațiile în concentrația Ca^{2+} pentru a declanșa contracția sau a obține relaxarea aparatului lor contractil. Se poate afirma că un sistem comparabil acționează în toate celulele, de vreme ce toate celulele posedă ansambluri contractile (deși de tipuri diferite).

• *Nucleozid mono-, di- și trifosfatazele* au fost găsite în RE și în fracțiunile microzomale ale multor tipuri de celule. Funcția lor locală este încă necunoscută. Unele dintre proteinele corespunzătoare pot reprezenta componente pentru alte membrane (plasmalema) în drum către destinația lor finală sau angajate în reciclare.

• *Glucozo-6-fosfataza este o enzimă integrală a RE din hepatocite, enterocite, epiteliile nefronului și, posibil, și din alte celule.* Ea defosforilează gluco-

Scanned with OKEN Scanner

zo-6-fosfatul, produsul final al fosforolizei glicogenului. Glucoza astfel produsă difuzează probabil sau este transportată rapid în plasma sanguină sau în fluidul interstițial prin plasmalemă. Fosfatul apare în spațiul cisternal sau în veziculele microzomale, unde poate fi precipitat de Pb^{2+} sau de alți agenți de captare folosiți în reacțiile citochimice. Sensul acestei sechestrări este încă obscur. Glucozo-6-fosfataza a fost considerată în trecut enzimă *marker* pentru fracțiunea microzomală (și deci pentru RE) și folosită pentru a estima gradul de contaminare a altor fracțiuni de către veziculele RE. Mai recent, enzima a fost detectată și în alte membrane celulare (de exemplu în veziculele Golgi). Mai mult, nu e de așteptat ca ea să fie enzimă *marker* pentru RE din toate celulele. Deci folosirea sa pentru a supraveghea puritatea fracțiunilor cere prudență și, dacă este posibil, dovezi independente în același sens.

3. *Oxigenaze cu funcție mixtă.* În anumite tipuri de celule membrana RE conține un sistem de enzime care hidroxilează compușii aromatici hidrofobi, importați din mediu sau produși de celulele înseși. Hidroxilarea face ca acești compuși să fie mai solubili în apă și mai ușor de metabolizat și eliminat. La mamifere, inclusiv la om, sistemul este prezent în celulele epiteliului intestial și este bine dezvoltat în hepatocite. Acestea sînt celule la care compușii ciclici exogeni (adesea prezenți în alimente) au acces imediat sau rapid.

Sistemul constă dintr-o flavoproteină care transferă electronii de pe NADPH unui anumit membru al familiei citocromilor (cit P-450, P-448). Reacția cu oxigenul a cit P-450 redus duce la reducerea unui atom de O la apă și la introducerea altui atom de O în compusul ciclic, care este astfel hidroxilat. În hepatocite acest sistem este implicat în hidroxilarea excesului de colesterol. Rezultă acizii biliari care, în final, sînt excretați în bilă. Acțiunea enzimei se exercită și asupra unor droguri ca fenobarbital, morfină, codeină, amfetamină. În acest caz, lanțul citocromului P-450 funcționează ca un *sistem de detoxifiere*. Multe medicamente sînt compuși ciclici potențial toxici și relativ hidrofobi. Un exemplu tipic sînt barbituricele. Asemenea droguri sînt prelucrate prin intermediul lanțului citocromului P-450, numit, din acest motiv, sistem de detoxifiere. Trebuie notat totuși că unii metaboliți intermediari în procesul de detoxifiere (de exemplu epoxizii) pot fi mai toxici sau mai intens carcinogeni decît compușii inițiali.

Sistemul de detoxifiere poate fi indus. Expuse la cantități excesive de compuși aromatici exogeni, celulele sînt capabile să acumuleze cantități mari de enzime hidroxilante, crescînd ritmul sintezei lor, în timp ce degradarea lor este încetinită. Acest proces, numit inducție, poate fi ușor declanșat la animalele de experiență (și probabil la om) prin administrarea de droguri aromatice sau hormoni steroizi. Inducția produce o proliferare caracteristică a RE, în special RE neted, deoarece celulele afectate au nevoie de mai multă membrană RE, pentru a se acomoda la necesitatea crescută de enzime detoxifiante, care sînt, toate, proteine integrale ale membranei RE.

4. *Alte sisteme detoxifiante.* În afară de hidroxilare, celulele folosesc și alte reacții enzimatice pentru a crește solubilitatea și a facilita eliminarea metaboliților sau drogurilor. Aceste reacții cuprind *conjugarea* cu glucuronat sau cu aminoacizi. Enzimele corespunzătoare sînt asociate tot cu membranele RE. Exemple tipice sînt glucuronidarea bilirubinei și conjugarea acizilor biliari cu glicina sau taurina.

Scanned with OKEN Scanner

5. *Rolul RE în prelucrarea proteinelor de secreție* (fig. 2.26).

• *Segregarea. Secvența-semnal.* Se știa de cîtva timp că proteinele destinate secreției sînt sintetizate de polizomii atașați și segregate rapid în spațiul cisternal al RER, dar mijloacele prin care celulele controlează traficul de proteine și realizează segregarea produșilor de secreție au fost clarificate recent. Capătul 5′ al ARNm al unei proteine secretorii codifică o secvență de 15—30 de aminoacizi, numită *secvență-semnal* (sau secvență-lider), care începe cu radicalul aminoacil inițiator sau cu vecinul său. Traducerea ARNm de către ribozomi într-o peptidă de secreție începe în matricea citoplasmatică,

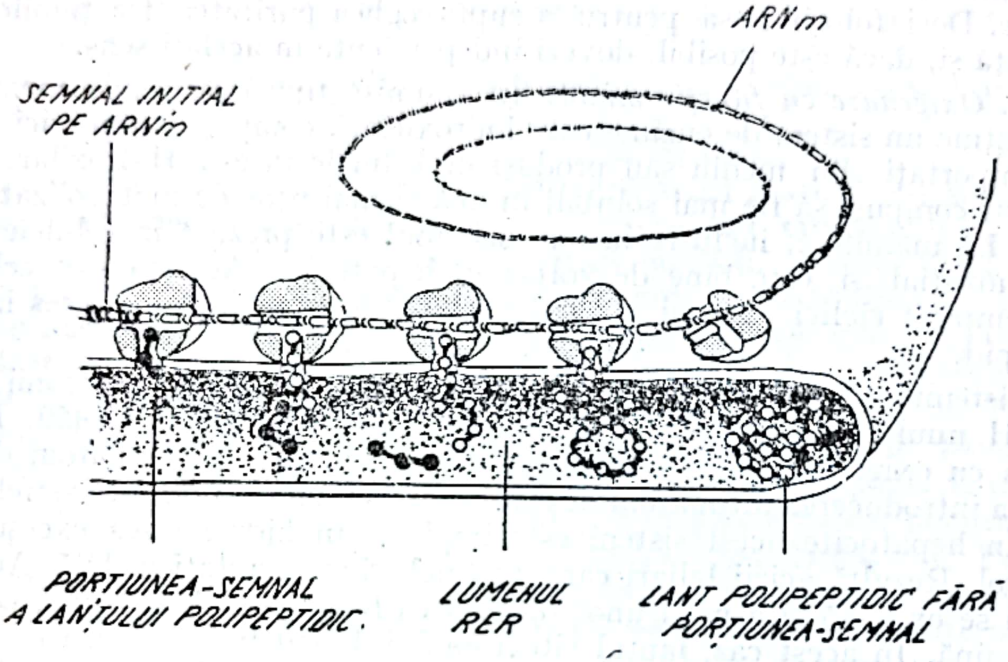


Fig. 2.26. — Sinteza și prelucrarea proteinelor de secreție în RER. Schemă.

iar în momentul completării sintezei secvenței-semnal, aceasta recunoaște (și este recunoscută de) locusuri specifice sau receptori din membrana RER. Interacțiunile ce urmează duc la o serie de evenimente importante: ribozomul se atașează de membrană iar polipepetidul în curs de elongare pătrunde prin membrană și este transferat prin ea, pe măsură ce traducerea progresează.

Secvența-semnal este îndepărtată, concomitent cu traducerea, de o endopeptidă pe versantul cisternal al membranei RE. Cînd traducerea s-a terminat și transferul polipeptidului nou sintetizat în spațiul cisternal este complet, ribozomul se detașează de membrană, subunitățile ribozomale disociază și reintră în fondul particulelor ribozomale libere din citosol.

Dacă ARNm al unei proteine de secreție este tradus *in vitro* în absența membranei RE, produsul este o „rudă mai mare" a proteinei ce se găsește în spațiul cisternal, deoarece secvența-seminal este prezentă ca o extensie a capătului N-terminal. Acest produs, numit preproteină (iar în unele cazuri, preproproteină), nu se găsește în celulele normale, dar poate apărea în matricea citoplasmatică atunci cînd producerea de ARNm-uri pentru proteinele de secreție nu mai este coordonată cu disponibilitatea de locusuri receptoare de pe membrana RE.

ARNm-urile proteinelor sintetizate pentru componente diferite ale matricei citoplasmatice nu au o secvență-semnal. Polizomii ce le produc

Scanned with OKEN Scanner

rămîn liberi iar produsul final, descărcat în citosol, este practic același cu produsul inițial al traducerii.

• *Alte modificări ale proteinelor segregate.* În spațiul cisternal, polipeptidele segregate sînt prelucrate mai departe, prin formarea de punți disulfidice, glicozilare parțială (în cazul glicoproteinelor) și modificarea unor radicali de aminoacizi (de exemplu hidroxilarea radicalilor de prolină și lizină în diferite tipuri de colagen). Ca rezultat al acestor modificări multiple, proteinele de secreție își creează structura terțiară finală (sau prefinală), cînd se află în spațiul cisternal. Enzimele modificatoare sînt fie proteine ale membranei RE, fie proteine conținute în spațiul RE. De remarcat că printre ele se găsesc acelea care realizează sinteza și transferul în bloc al lanțurilor de oligozaharide pentru glicozilarea proteinelor. Transferul implică un transportor lipidic special, și anume un ester fosfatic al unui lung lanț izoprenoid numit dolichol. Oligozaharidul transferat este legat, concomitent cu traducerea, de un radical de asparagină.

Mai puțin se știe în prezent despre distribuția intracelulară a enzimelor implicate în legarea O-glicozidică a oligozaharidelor de radicalii de serină și treonină ai glicoproteinelor. Aceste enzime sînt probabil proteine ale membranei aparatului Golgi.

Polimerizarea lanțurilor de polipeptide în proteine heteropolimerice, ca imunoglobulinele sau colagenii, se produce de asemenea în spațiul cisternal.

Dovezi concludente arată că enzimele lizozomale sînt sintetizate, segregate și prelucrate ulterior în același mod cu proteinele de secreție: Înseamnă să spațiul cisternal adăpostește în interiorul său un fond comun de proteine pentru secreția „deschisă", pentru enzimele lizozomale, ca și proteine proprii reticulului endoplasmic, cum ar fi cele cîteva enzime modificatoare menționate anterior. Mecanismele implicate în sortarea diferitelor componente ale acestui fond comun și îndreptarea lor către destinația finală, nu sînt încă bine cunoscute.

• *Sinteza și asamblarea proteinelor transmembranare.* Glicoproteinele transmembranare și proteinele învelișului viral ce au fost investigate pînă acum sînt sintetizate și prelucrate ca și proteinele secretorii, cu excepția că transferul polipeptidului corespunzător (inițiat de o secvență-semnal) este oprit la mijlocul drumului prin membrană, încît proteina capătă o topografie transmembranară, cu un endodomeniu ce rămîne în citosol și un ectodomeniu către spațiul cisternal. Numai ectodomeniul este glicozilat.

2.5.8. COMPLEXUL GOLGI

Complexul Golgi * este un set de compartimente mărginite de membrană, interpus între RE și plasmalemă. Componenta sa structurală constantă și caracteristică este o stivă de cisterne cu suprafața netedă (fig. 2.27). Funcțiile sale cuprind modificări post-traducere ale proteinelor de secreție (în primul rînd prin glicozilare terminală și proteoliză parțială), împachetarea

* Camillo Golgi — medic și citolog italian (1844—1926). Premiul Nobel în 1906. Numele dat de Golgi structurii descoperite de el este *aparat reticular intern*.

Scanned with OKEN Scanner

produselor de secreție în vezicule mărginite de membrane capabile de exocitoză, sortarea enzimelor lizozomale pentru transport la lizozomi și glicozilarea terminală a glicoproteinelor plasmalemale.

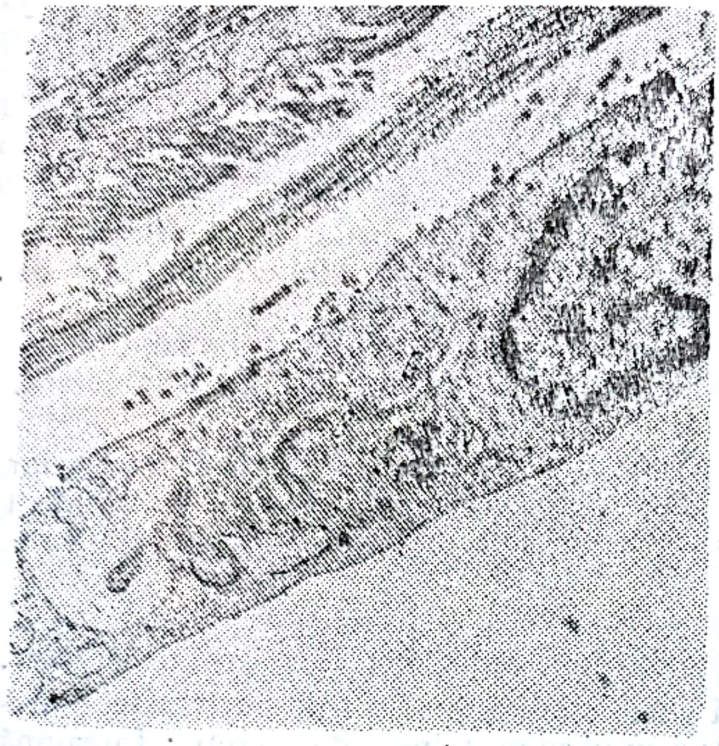


Fig. 2.27. — Complex Golgi (*G*); *V* — vezicule acoperite. Electronomicrografie × 5 500.

2.5.8.1. Morfologie generală

Complexul Golgi se găsește în celulă în mai multe exemplare distincte (vezi fig. 2.27). Fiecare exemplar constă dintr-o *stivă de cisterne* asociată cu *vezicule mici* (numite *vezicule Golgi periferice)*, pe versantul ce interacționează cu RE, și cu *vacuole Golgi mari*, pe latura ce întreține schimburi cu plasmalema (fig. 2.28). Prima latură se numește *cis** iar a doua, *trans***. Complexul are deci o polaritate ușor de observat. În afară de latura *cis* și de latura *trans*, următoarele perechi de sinonime sînt folosite în literatură pentru a descrie polaritatea complexului Golgi: 1) fața convexă și fața concavă; 2) fața proximală și fața distală; 3) fața imatură și fața matură. 1 și 2 sînt întotdeauna aplicabile din cauza variațiilor de formă și de orientare intracelulară a stivelor de cisterne Golgi, iar 3 afirmă mai mult decît știm în prezent despre funcția elementelor *cis*.

Stiva constă dintr-un număr variabil de *cisterne discoidale* (3—10 sau mai multe), fiecare cu diametrul de 0,5 pînă la 1,0 μm. Părțile lor centrale apar aproape turtite, în timp ce periferia lor este destinsă de produsele de secreție acumulate. Pe latura *cis*, stiva interacționează cu elemente speciale ale RE, numite *elemente tranziționale*, deoarece membrana ce le mărginește are atașați polizomi pe o latură (ca RER), este netedă (ca veziculele Golgi) și cu mici expansiuni pe cealaltă latură.

* *Cis* (lat.) = dincoace.
** *Trans* (lat.) = dincolo.

Scanned with OKEN Scanner

Mici vezicule Golgi periferice (50 nm diametru), menționate mai sus, sînt îngrămădite între elementele tranziționale ale RE și stive, ca și în jurul circumferinței stivelor.

Vacuolele de pe latura *trans* a cisternelor au diametrul de 0,2—1 μm și, în funcție de tipul de celulă, sînt destinse mai mult sau mai puțin de produse de secreție în diferite stări de condensare (concentrare). În asemenea situații vacuolele Golgi sînt numite și vacuole de condensare.

În multe celule vegetale, membrana elementelor Golgi este subțire de aproximativ 6 nm (ca la reticulul endoplasmatic) pe latura *cis* a complexului și mult mai groasă, de aproximativ 10 nm (ca plasmalema), pe latura *trans*, tranziția de la un tip de membrană la altul apărînd la nivelul cisternelor.

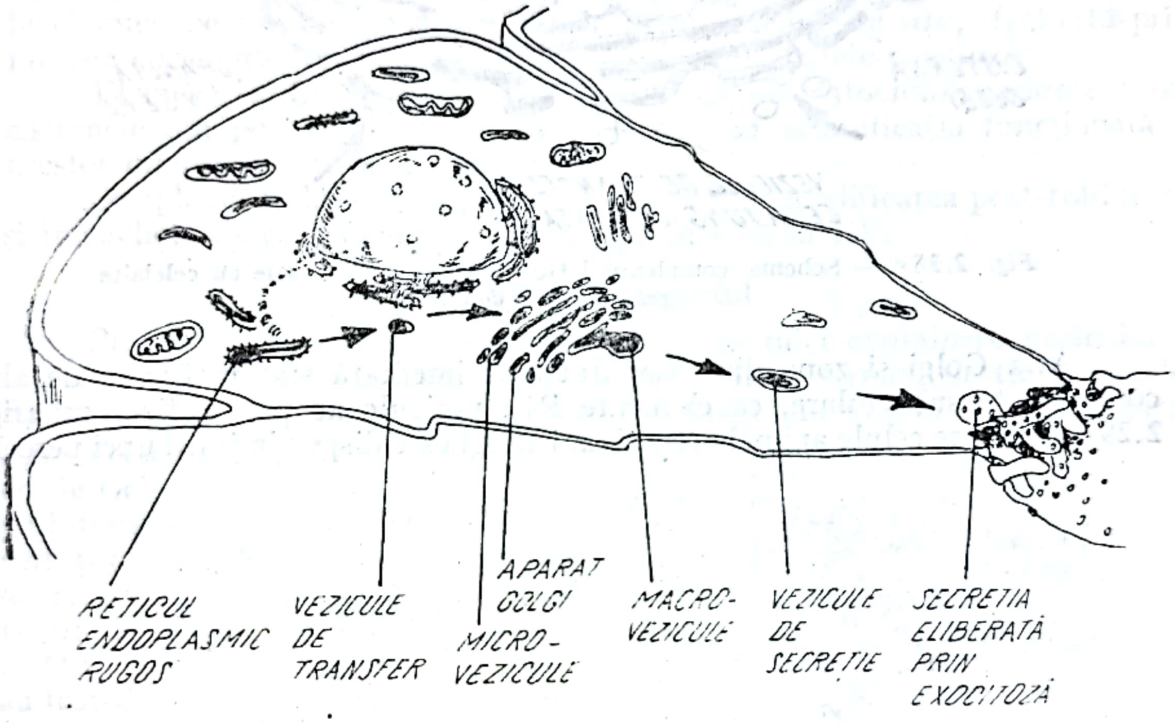


Fig. 2.28 a

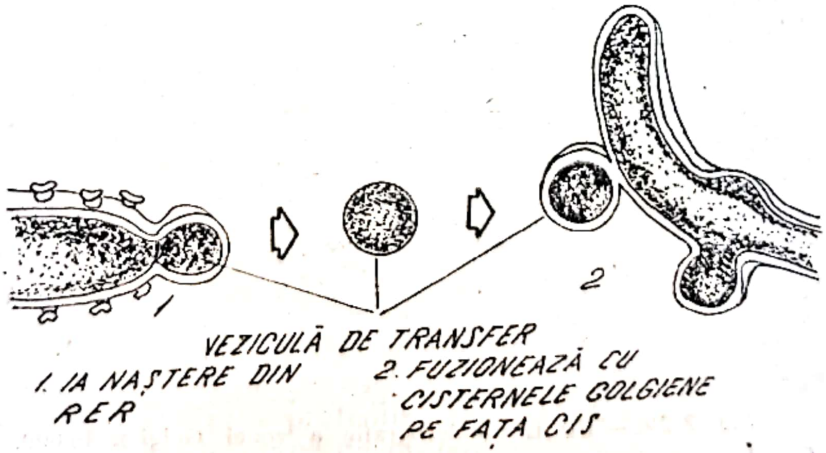


Fig. 2.28 b

Scanned with OKEN Scanner

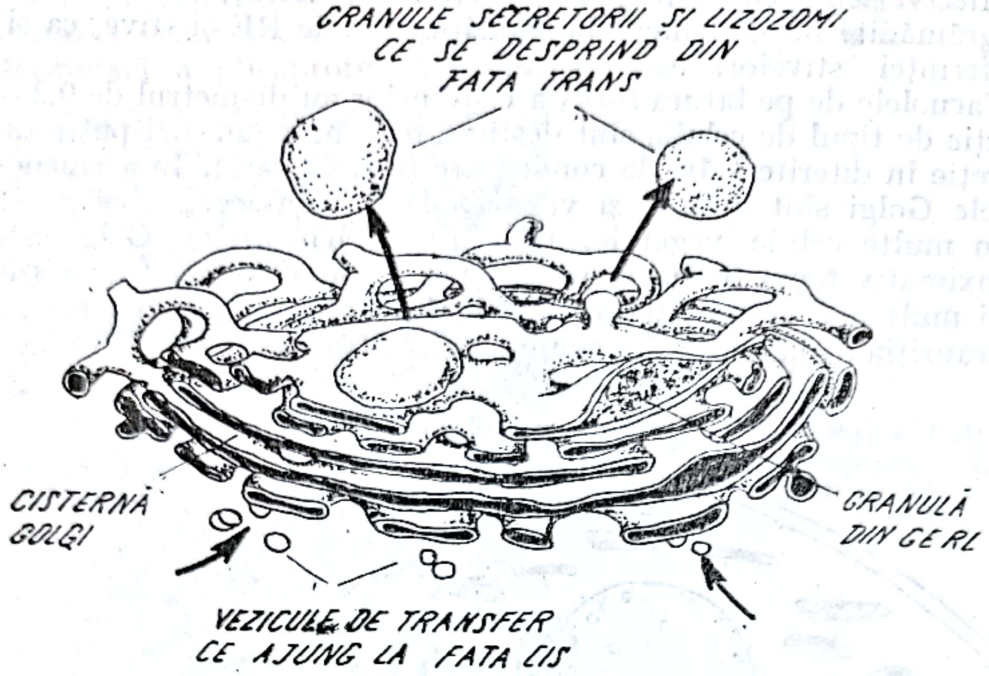


Fig. 2.28 c. — Schema complexului Golgi și a relațiilor sale cu celelalte componente celulare.

Aria Golgi și zona din vecinătatea ei imediată sînt încărcate de alte componente subcelulare, ca elemente RE, vezicule acoperite, lizozomi (fig. 2.29). În multe celule animale complexul Golgi este dispus în jurul unei perechi

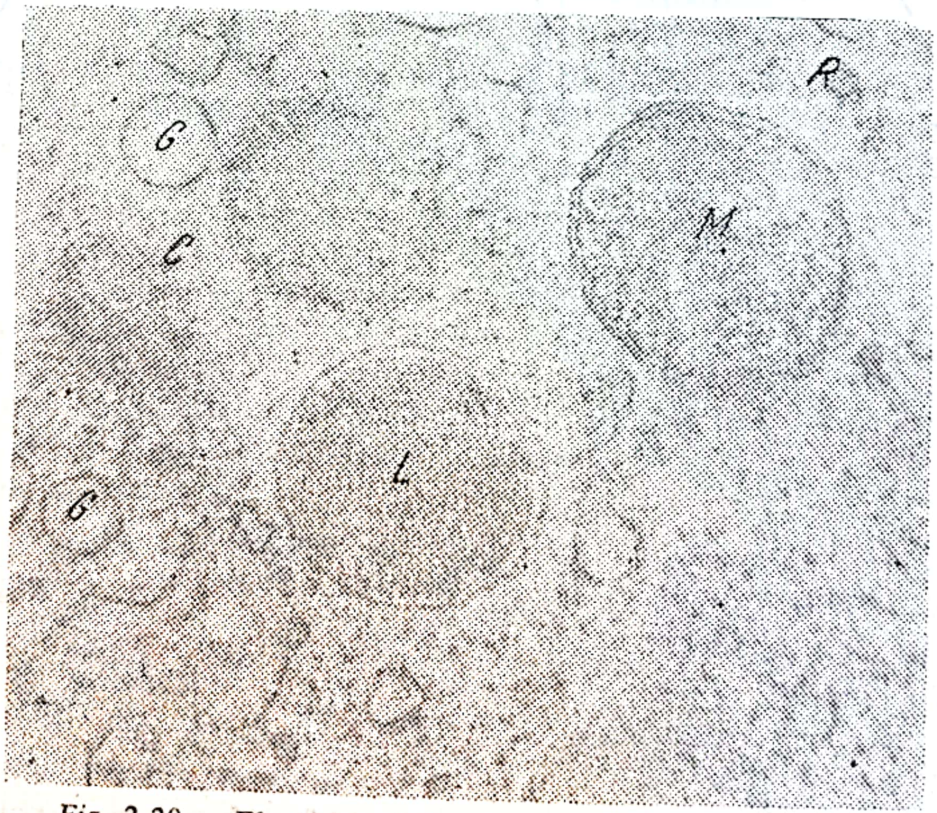


Fig. 2.29. — Electronomicrografie a zonei Golgi × 16 000.
G — macrovezicule golgiene; *L* — lizozom primar; *C* — centriol; *R* — ribozomi liberi; *M* — mitocondrii.

Scanned with OKEN Scanner

le centrioli, care împreună cu sateliții centriolari, cu microtubulii și fascicule de microfilamente constituie *centrosfera*.

Pe fața *trans* a multor stive Golgi apare o cisternă cu morfologie caracteristică, și anume: aspect rigid, grosime relativ constantă și conținut dens, lamelar. Deoarece în interiorul ei poate fi detectată activitatea fosfatazei acide (ca în lizozomi), s-a postulat că această cisternă și structurile asociate cu ea, constituie o legătură între complexul Golgi, RE și lizozomi. De aici, acronimul GERL folosit pentru a o desemna (vezi fig. 2.27).

2.5.8.2. Funcții

Funcțiile complexului Golgi au fost mai puțin investigate decît cele ale RE, în primul rînd pentru că fracțiuni Golgi suficient de necontaminate au fost obținute numai relativ de curînd. În prezent, din studiile biochimice pe fracțiunile Golgi izolate și din studiile *in situ*, efectuate prin metode citochimice și autoradiografie, reies următoarele concluzii:

Elementele Golgi sînt heterogene: reacțiile citochimice diferențiază cisternele din pozițiile extreme *cis* și *trans*, dar semnificația funcțională a acestor diferențe rămîne necunoscută.

Complexul Golgi este implicat în transportul, modificarea post-traducere și împachetarea proteinelor de secreție primite de la RE.

2.5.8.2.1. Transportul

Proteinele de secreție sînt transportate în mici containere veziculare, care se consideră că funcționează ca „navete", între elementele tranziționale ale RE și capetele destinse ale cisternelor Golgi sau vacuolelor pe de fața *trans* a complexului. Veziculele Golgi periferice de pe latura *cis* a stivelor sînt probabil containere de rezervă. În anumite tipuri de celule, totuși, legături tubulare patente au fost descrise între RE și elementele Golgi. Transportul este vectorial și dependent de energie. Produsele se mișcă într-o singură direcție, de la RE la aparatul Golgi, și sînt blocate la nivelul elementelor tranziționale ale RE, dacă celula nu poate sintetiza ATP.

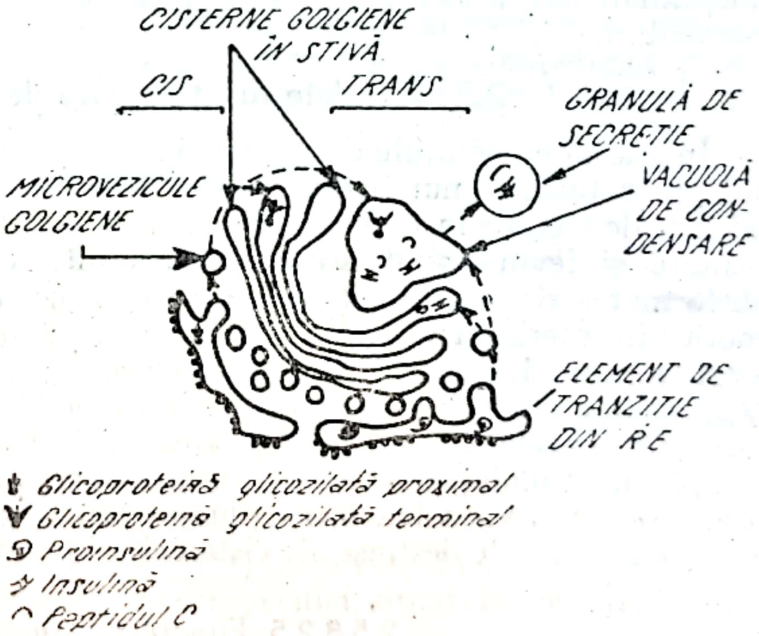


Fig. 2.30. — Funcțiile aparatulni Golgi. Schemă.

2.5.8.2.2. Modificarea proteinelor

În timp ce sînt în tranzit prin complexul Golgi, cîteva din proteinele de secreție sînt modificate prin proteoliză parțială și/sau prin glicozilare (fig. 2.30). Una sau mai multe etape de proteoliză îndepărtează segmente scurte terminale din lanțurile polipeptidice (de exemplu cazul albuminelor în hepa-

tocite) sau bucle (cazul insulinei în celulele beta ale insulelor pancreatice). în alte tipuri de celule (de exemplu celulele glandei pituitare) un precursor mare, comun este convertit într-o serie de peptide distincte. În asemenea cazuri produsul primit de la RE este numit proproteină (proalbumină, proinsulină, proopiocortină etc.), numele obișnuit fiind rezervat pentru produsul descărcat în final de către celulă. De reamintit că proinsulina derivă dintr-o traducere primară, numită preproinsulina. Aceleași serii de pre- și pro-precursori intervin în cazul multor proteine de secreție.

Glicoproteinele de secreție ajung în complexul Golgi deja parțial glicozilate. Cînd ajung, oligozaharidele lor sînt parțial ajustate de glicozidazele golgiene. Lanțurile rămase sînt glicozilate mai departe prin adăugarea treptată a altor monozaharide—adică N-acetilglucozamină, galactoză, acid sialic (în această ordine) și, uneori, fucoză. Transferazele care catalizează aceste reacții sînt proteine ale membranei Golgi și una dintre ele (galactozil-transferaza) este considerată enzimă *marker* pentru complexul Golgi.

Sulfatarea glicoproteinelor și a glicozaminoglicanilor este de asemenea restrînsă la complexul Golgi și același lucru se aplică la fosforilarea proteinelor de secreție, cum ar fi cazeina, produsă de celulele glandei mamare.

2.5.8.2.3. Împachetarea

În complexul Golgi proteinele de secreție sînt împachetate în „containere" mărginite de membrană, competente să interacționeze cu plasmalema și să elibereze prin exocitoză conținutul lor în mediul extracelular. Aceste containere sînt numite vacuole de secreție sau granule de secreție. Proteinele memebranare ale acestora sînt diferite de cele ale plasmalemei și mai puțin numeroase.

2.5.8.2.4. Alte funcții legate de secreție

În afară de operațiile descrise mai sus, care apar în majoritatea celulelor (dacă nu în toate), anumite celule glandulare au capacitatea de a concentra produsele de secreție în vacuole Golgi, care se umplu progresiv, își condensează conținutul și devin granule secretorii. Concentrarea conținutului se realizează prin formarea de agregate (complexe), ceea ce duce la reducerea activității osmotice în interiorul vacuolelor Golgi și deci la o mișcare pasivă a apei din vacuole în citosol. Concentrarea (și corolarul ei, formarea granulelor de secreție) apare în celulele care depozitează produsele de secreție intracelular. Depozitarea intracelulară le dă posibilitatea să-și elibereze produsele de secreție în masă, la stimularea de către neurotransmițători sau hormoni. Concentrarea are loc fie în vacuolele *trans* (numite din acest motiv vacuole de condensare), fie în capetele destinse ale cisternelor în stivă.

2.5.8.2.5. Funcții prezumtive

Funcțiile menționate sînt susținute de dovezi directe, deși nu întotdeauna definitive. Alte funcții ale aparatului Golgi sînt presupuse pe baza unor dovezi indirecte. Asemenea funcții cuprind sortarea enzimelor lizozomale și îndreptarea lor spre lizozomi (în loc de granule de secreție și vacuole), precum și modificările, în primul rînd prin glicozilare, ale glicoproteinelor în tranzit de la RE la plasmalemă.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.9. CALEA SECRETORIE

Celulele secretoare de proteine își folosesc reticulul endoplasmic, complexul Golgi și granulele de secreție ca pe o serie de compartimente aflate în interconexiune, în care produsele lor, segregate în spațiul cisternal al reticulului endoplasmic, sînt succesiv modificate, concentrate și stocate temporar înainte de descărcare. Prin extensie, termenul de „spațiu cisternal" este folosit pentru spațiul conținut în toate aceste compartimente, care în totalitate poartă numele de cale secretorie. Această cale amintește de o linie de asamblare în care diferitele etape de producere sînt separate logic în timp și spațiu.

2.5.9.1. Exocitoza *

Proteinele, glicoproteinele și lipoproteinele produse pentru export, se mișcă în containere mărginite de membrană (vezicule sau granule de secreție) dinspre complexul Golgi la plasmalemă. Membrana acestora poate fuziona cu plasmalema fie spontan, fie la stimularea celulei de către un factor secretagog**, de obicei hormoni, factori de eliberare sau neurotransmițători. Fisiunea bistraturilor lipidice în aria fuziunii membranelor creează un orificiu prin care produsele de secreție pot fi descărcate în masă din containerele lor. Exocitoza face celula capabilă să descarce macromoleculele în masă, în timp ce membrana își menține intactă bariera de permeabilitate pentru moleculele mici. Procesul necesită energie și calciu mobilizat din locurile de depozit intracelular sau provenit din mediul extracelular. Membrana veziculelor este rapid recuperată ca vezicule mici (deseori vezicule acoperite) și probabil folosită în mod repetat (reciclată). În celulele exocrine competența pentru exocitoză este limitată la domeniul apical (luminal) al plasmalemei.

2.5.10. ENDOCITOZA

Endocitoza este înglobarea în masă de către celulă a moleculelor mari (G.M. > 10 000) în invaginări și apoi în vezicule ce se formează din membrana celulară.

După natura materialului endocitat și după mecanismul înglobării se disting două tipuri de endocitoză: *a*) endocitoza de molecule, particule, microorganisme, detritus celular, celule, neînsoțite de fluid, numită fagocitoză***; *b*) endocitoza de fluid conținînd molecule sau particule, numită pinocitoză ****.

În *fagocitoză*, particula *(non-self*****) care este înglobată, se fixează direct sau prin opsonine****** de receptori specifici, situați în anumite regiuni

---

* *Exocytosis* (gr.) = descărcare în afara celulei; se referă la descărcarea de material în masă.

** *Secretagog* (gr.) care stimulează secreția.

*** *Phagein* (gr.) = a mînca.

**** *Pinein* (gr.) = a bea.

***** *Non-self* (engl.) = străin de structurile organismului.

****** Opsonine = proteine extracelulare care mediază și facilitează legătura între receptorii membranari ai fagocitelor și antigenele care vor fi fagocitate.

Scanned with OKEN Scanner

ale membranei celulare. Fixarea particulei activează receptorii, care interacționează cu proteinele contractile din citoscheletul membranei, ceea ce duce la emiterea de pseudopode. Acestea înconjură particula și apoi se unesc; prin fuziunea membranelor se formează o veziculă numită *fagozom*, ce cuprinde particula. În citoplasmă fagozomii se unesc cu lizozomii.

Fagocitoza este un proces energodependent.

Celulele capabile de fagocitoză sînt numite fagocite. În această categorie intră microfagele care înglobează particule mici (granulocitele) și macrofagele ce înglobează particule mari, fragmente de celule sau chiar celule întregi. Macrofagele din diferite țesuturi, cu originea în măduva osoasă roșie, formează sistemul monocito-macrofagic.

Pinocitoza se întîlnește la toate tipurile de celule, fiind una din căile de captare din fluidul tisular a substanțelor necesare metabolismului celular.

S-au descris două tipuri de pinocitoză:

a) Pinocitoza în fază fluidă, fără receptori, constă din înglobarea de fluid, conținînd molecule sau particule, în *invaginări* ale membranei celulare fără receptori ce devin apoi vezicule numite *pinozomi*.

Soarta veziculelor este diferită. Ele se pot uni cu lizozomii, conținutul lor fiind degradat, iar membrana reciclată. Altă posibilitate este ca veziculele să traverseze citoplasma și să fie exocitate în altă regiune a membranei, proces numit *transcitoză* (calea de transport în celulele endoteliale).

b) Pinocitoza adsorbtivă, selectivă, concentrativă, mediată de receptori, constă din înglobarea unor molecule variate prin invaginarea unor zone specializate ale membranei celulare, cu receptori ce leagă aceste molecule. Aceste invaginări sînt numite *caveole acoperite*, deoarece sînt acoperite pe versantul citoplasmatic de un înveliș de clatrină, proteină ce stabilizează poziția receptorilor.

Complexele molecule (particule)-receptori sînt internalizate împreună cu mici cantități de fluid în *vezicule acoperite* sau în *receptozomi* (vezicule netede ce rezultă prin pierderea învelișului de clatrină). În veziculele acoperite concentrația substanțelor endocitate este mai mare decît în fluidul extracelular, datorită capacității selective de fixare a lor de către receptori.

Particulele înglobate prin pinocitoza mediată de receptori sînt de obicei degradate în lizozomi; uneori receptozomii traversează citoplasma fără să interacționeze cu lizozomii, iar conținutul lor este exocitat.

Caveolele acoperite și receptozomii au statutul de organite subcelulare de transport.

2.5.11. LIZOZOMII

Lizozomii sînt structuri în formă de veziculă care conțin enzime digestive și funcționează ca sistem digestiv intracelular.

2.5.11.1. Organizarea lizozomilor

Caracterele generale ale lizozomilor sînt: conținutul lor în enzime digestive, prezența unei membrane limitante și heterogenitatea lor structurală.

Scanned with OKEN Scanner

Lizozomii conțin peste 40 de enzime digestive, printre care: proteaze, nucleaze, glicozidaze, lipaze, fosfolipaze, sulfataze și fosfataze. Cu acest set de enzime lizozomii sînt capabili să digere majoritatea constituenților celulelor și țesuturilor, adică proteine, acizi nucleici, lipide, hidrați de carbon și glicozaminoglicani, pînă la elementele constitutive de bază: aminoacizi sau dipeptide, monozaharide și acizi grași.

Marea majoritate a enzimelor lizozomale sînt hidrolaze acide (cu activitatea optimă la pH <5,0). pH-ul intralizozomal este menținut mai scăzut decît cel al citosolului. Mai multe enzime au fost folosite ca enzime *marker* pentru identificarea lizozomilor în timpul fracționării celulare (fosfataza acidă, N-acetil beta-glucozaminidaza, catepsina C) sau pe secțiuni de țesuturi (fosfataza acidă, arilsulfataza).

Membrana limitantă a lizozomului, care este o membrană „unit" tipică, de varietate plasmalemală, acționează ca o barieră între enzimele digestive și citozol, împiedicînd pătrunderea acestor hidrolaze, potențial letale, în matricea citoplasmatică.

Heterogenitatea structurală a lizozomilor se datorează faptului că, în afară de hidrolaze acide, ei conțin materiale care sînt supuse digestiei și care pot fi prezente în diferite stadii de degradare. Adeseori, reziduuri de componente extra- sau intracelulare parțial digerate por fi observate în interiorul lizozomului. Această heterogenitate a formei și conținutului a făcut ca identificarea lizozomilor pe secțiunile de țesuturi și izolarea lor ca fracțiune celulară pură să fie greu de realizat, caracteristicile lor morfologice și constantele de sedimentare nefiind uniforme. Deci, folosirea enzimelor-*marker* a jucat un rol esențial în studiul și caracterizarea lizozomilor, atît prin fracționare celulară cît și la microscopul electronic.

2.5.11.2. Funcțiile lizozomilor

2.5.11.2.1. Sistemul lizozomal

În realitate lizozomii reprezintă nu o singură entitate, ci un întreg sistem, numit sistem vacuolar sau sistem lizozomal, care funcționează ca un „tract digestiv" intracelular. Filogenetic acest sistem își are precursorul în vacuolele digestive ale protozoarelor (de exemplu amibele), care funcționează în nutriția acestor organisme. Alimentele sînt luate în bloc, digerate în vacuole, iar produsele sînt folosite pentru metabolismul celulei.

Lizozomii sînt ubicuitari în celulele animale (fac excepție hematiile mamiferelor), iar organite comparabile se găsesc în celulele vegetale. Totuși, în organismele superioare activitatea primitivă de digestie intracelulară a fost adaptată în multe feluri pentru a servi nevoilor întregului organism.

2.5.11.2.2. Intrarea în lizozomi

Substanțele care primesc acces în lizozomi pot veni fie din afara celulei, prin heterofagie sau prin difuziune directă, fie din interiorul celulei, prin autofagie sau crinofagie. *Heterofagia* constă din preluarea în masă de substanțe din afara celulei prin invaginarea membranei plasmatice sau endocitoză. Încorporarea poate avea loc prin vezicule mici, pline cu fluid, conținînd mici molecule sau particule (pinocitoză), sau în buzunare mari care înglobează microorganisme, detritus celular sau chiar celule întregi (fagocitoză). În

Scanned with OKEN Scanner

cazul fagocitozei membrana este de obicei strîns aderentă de particula ce intră, pe cînd în pinocitoză moleculele încorporate intră ca parte a conținutului veziculei (pinocitoza în fază fluidă) sau se leagă de membrană (endocitoză adsorbtivă sau mediată de receptori). Cîteva substanțe capătă acces la lizozomi prin pătrundere directă sau difuziune pasivă, deoarece datorită micimii lor și solubilității în bistratul lipidic pot pătrunde direct prin membrana celulară și prin membrana lizozomală. În unele cazuri, ele se concentrează în lizozomi, deoarece intră într-o formă neîncărcată, sînt convertite într-o formă încărcată și astfel sînt sechestrate în lizozomi. Exemple de substanțe care suferă probabil un astfel de proces de concentrare în lizozomi sînt unii coloranți bazici (roșu-neutru, acridin-oranj), droguri (clorochina), carcinogeni (hidrocarburi clorurate).

Constituenții celulari au acces la lizozomi prin fuziune directă, de exemplu cu veziculele (granulele) secretorii — *crinofagie* — sau prin autofagie. *Autofagia* este un proces de înglobare în masă, prin care fragmente de citoplasmă, adesea conținînd organite celulare, sînt înconjurate de o cisternă cu membrană netedă, derivată din aparatul Golgi sau din RE și sînt în final segregate de citoplasma înconjurătoare. Autofagia este obișnuită în țesuturile ce suferă un proces de remodelare (ca în timpul embriogenezei), dacă se produce o marcată involuție celulară, sau atunci cînd o celulă suferă o leziune subletală.

2.5.11.2.3. Soarta materialului ingerat de celulă

Toate materialele ingerate, fie ele încorporate prin heterofagie, autofagie sau crinofagie, se regăsesc împrenă în lizozomi și au aceeași soartă, adică digestia mai mult sau mai puțin completă (fig. 2.31). Produsele (dipeptide, aminoacizi, monozaharide și acizi grași) sînt destul de mici încît să difuzeze ușor prin membrana lizozomală, intră în fondul de molecule libere din citoplasmă și sînt reutilizate în biosinteză. În mod normal, lizozomii trec prin cicluri repetate de incorporare și digestie, fiind tot timpul reîncărcați cu o nouă garnitură de enzime digestive, prin fuziunea cu *lizozomii primari* (vezi fig. 2.29) (adică cu vezicule sau granule derivate in aparatul Golgi care sînt pline cu enzime lizozomale nou sintetizate). Cîteodată lizozomii pot fi blocați de reziduuri nedigerabile, ce apar în mod natural (de exemplu lipofuscina), sau sînt introduse accidental (silicați, azbest). Acestea pot determina defecte în funcția lizozomală sau pot duce la ruptura lizozomilor. Unele celule descarcă asemenea reziduuri nedigerabile prin exocitoză. De exemplu, hepatocitele își descarcă reziduurile lizozomale în bilă, pe aria domeniului biliar al celulei. Membrana folosită pentru livrarea substanțelor încorporate de celulă lizozomilor (adică membrana ce delimitează fagozomii) este reutilizată sau reciclată, ceea ce înseamnă că după fuziunea cu un lizozom, membrana aferentă se separă și este returnată plasmalemei, unde poate participa la un alt ciclu de endocitoză.

Scanned with OKEN Scanner

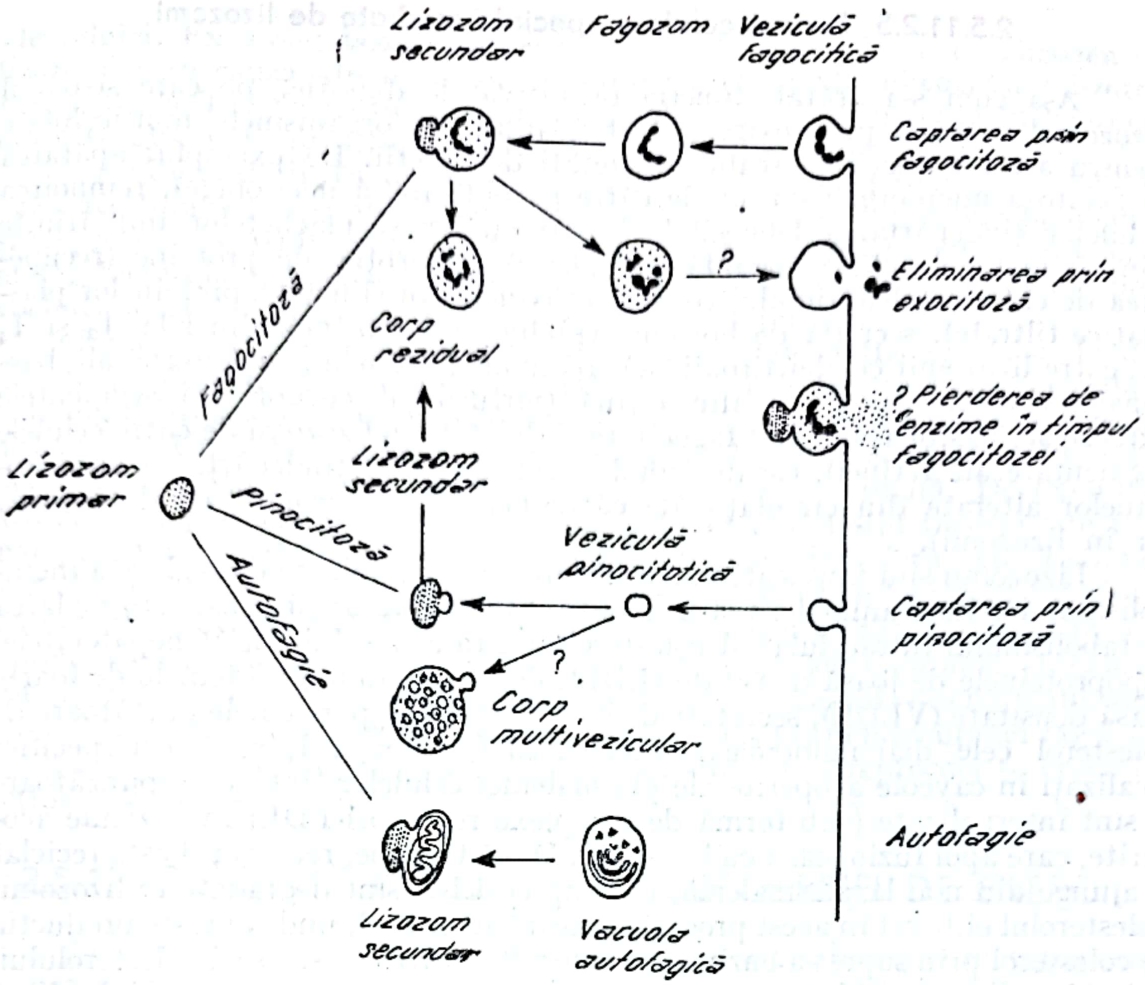


Fig. 2.31. — Materialul ingerat de celulă din mediul extracelular prin endocitoză (pinocitoză și fagocitoză) sau provenind din surse intracelulare (autofogie sau crinofagie) este cantonat în vezicule mărginite de membrană (fagozomi, pinozomi, vacuolă autofagică), care se unesc cu lizozomii primari, formînd vacuole digestive active — lizozomi secundari. Vacuolele ce conțin material nedigerat — corpi reziduali — își descarcă conținutul prin exocitoză.

2.5.11.2.4. Sursa enzimelor lizozomale

Probele disponibile arată că, în cea mai mare parte, enzimele lizozomale sînt glicoproteine, sintetizate și prelucrate pe aceeași cale ca și proteinele secretorii. Ele sînt într-un fel sortate în complexul Golgi și împachetate în mici vezicule (de obicei vezicule acoperite cu clatrină) în majoritatea celulelor sau în granule distincte, în cazuri speciale, ca în granulocite. Conținutul acestor vezicule sau granule, numite lizozomi primari, este livrat unor lizozomi (activi) secundari prin fuziunea membranelor. Cîteva tipuri de celule, în primul rînd fibroblastul, secretă și înglobează selectiv din mediul extraceluler enzime lizozomale. Această descoperire a dus la ipoteza (nemaiacceptată în prezent) că enzimele lizozomale trebuie să fie întîi descărcate în afara celulei și apoi înglobate prin endocitoză pentru a fi livrate lizozomilor.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.11.2.5. Funcții celulare speciale mediate de lizozomi

Așa cum s-a arătat, funcția primitivă de digestie, pe care sistemul lizozomal o are la protozoare, a fost adaptată în organismele multicelulare pentru a servi unei remarcabile varietăți de funcții. De exemplu: apărarea (fagocitoza microorganismelor de către granulocite și macrofage), reînnoirea celulelor (îndepărtarea leucocitelor, eritrocitelor și plachetelor îmbătrînite din circulație de către macrofagele splinei), absorbția de proteine (recuperarea de către celulele tubului contort proximal din rinichi, a proteinelor plasmatice filtrate), secreția de hormoni (prelucrarea tireoglobulinei la T_3 și T_4 de către lizozomii celulei tiroidiene), reînnoirea segmentelor externe ale bastonașelor celulelor vizuale din retină (vîrfurile discurilor din segmentele externe ale bastonașului sînt fagocitate și digerate în lizozomi de către celulele pigmentare ale retinei), catabolismul glicoproteinelor (îndepărtarea glicoproteinelor alterate din circulație de către hepatocite, urmată de degradarea lor în lizozomi).

Lizozomii sînt implicați în mecanisme mai complicate de reglare a metabolismului celulei animale. Cel mai bine studiată, în acest sens, este reglarea metabolismului intracelular al colesterolului, în alte celule decît hepatocitele. Lipoproteinele de joasă densitate (LDL), derivate din lipoproteinele de foarte joasă densitate (VLDL), secretate de hepatocite, sînt particulele purtătoare de colesterol cele mai numeroase în sînge. LDL se leagă de receptori specifici localizați în caveole acoperite ale plasmalemei celulelor-țintă corespunzătoare și sînt internalizate (sub formă de complexe receptori-LDL) în vezicule acoperite, care apoi fuzionează cu lizozomii. După fuziune, receptorul este reciclat și ajunge din nou la plasmalemă, în timp ce LDL sînt degradate în lizozomi. Colesterolul eliberat în acest proces difuzează în citosol, unde oprește producția de colesterol prin supresia enzimei ce controlează ritmul sintezei colesterolului, hidroximetil glutaril-CoA-reductaza. Creșterea concentrației colesterolului liber în citoplasmă duce de asemenea la sistarea sintezei de receptori ai LDL. Alte exemple de macromolecule care pot fi importante în reglarea metabolismului celular și care sînt înglobate prin endocitoză mediată de receptori sînt hormonii peptidici (insulina, factorul de creștere epidermică, beta-MSH, gonadotropinele), transcobalamina, transferina, proteinele viteline, imunoglobulinele materne. În aceste cazuri consecințele biologice ale înglobării sînt mai puțin clare, dar în multe cazuri efectele lor asupra metabolismului celular implică participarea lizozomilor. Uneori, lizozomii par a fi ocoliți, cum se întîmplă în cazul proteinelor viteline și al imunoglobulinelor materne.

2.5.11.3. Implicațiile medicale

În prezent, se știe mai mult despre rolul lizozomilor în patologia celulară decît despre rolul oricărui alt organit celular.

Datorită monopolului pe care-l dețin asupra funcției de digestie intracelulară, ei sînt implicați direct sau indirect în orice proces patologic în care există moarte celulară, involuție celulară sau leziuni ale celulei. În plus, există un mare grup de boli — peste 20 — cunoscute ca boli lizozomale de depozit, datorate defectului genetic sau deleției uneia sau mai multor enzime lizozomale. Ca rezultat, substratul enzimei lipsă se acumulează în lizozomi și aceste organite devin mari și numeroase, încît stînjenesc funcțiile normale

Scanned with OKEN Scanner

ale celulei. Exemple: boala Pompe care duce la acumularea de glicogen în lizozomi (din cauza absenței sau activității slabe a alfa-glicozidazei lizozomale), boala Tay-Sachs în care gangliozidul GM_2 se acumulează în lizozomi datorită absenței sau deficienței hexozaminidazei A lizozomale.

În alte situații, ca în gută sau silicoză, procesul patologic ce stă la baza acestora este expresia acumulării de reziduuri nedigestibile (acid uric și respectiv silicați) în interiorul lizozomilor, ceea ce lezează membrana lizozomală, ducînd la scurgerea enzimelor lizozomale în citosol și prin aceasta provocînd moartea celulelor și lezarea țesuturilor implicate.

Funcționarea normală a apărării organismului contra agenților bolilor infecțioase depinde de amplificarea heterofagiei și de funcționarea normală a sistemului lizozomal al granulocitelor .și macrofagelor în timpul răspunsului inflamator. Unele boli, în primul rînd cele granulomatoase, rezultă din faptul că microorganismele patogene stînjenesc heterofagia normală. De exemplu, toxoplasmele, brucelele, listeriile și bacilii tuberculozei sînt încorporate normal prin fagocitoză, dar ele produc substanțe care interferă cu fuziunea între fagozomi și lizozomi primari, încît ele rămîn nestînjenite în interiorul fagozomilor. Un alt tip de interferență este cel din lepră: microorganismul leprei are o capsulă care rezistă digestiei de către enzimele lizozomale, făcîndu-l apt să trăiască în interiorul fagolizozomilor. În alte cazuri, microorganismele produc probabil toxine membranolitice care duc la ruptura membranei fagolizozomului după ingestia lor. Streptolizinele produse de streptococi se crede că acționează în acest mod.

2.5.12. SISTEMELE CELULARE ALE CONVERSIEI DE ENERGIE

Pentru a îndeplini funcțiile descrise, pentru a produce și a menține echipamentul care efectuează aceste funcții, celulele depind în mod critic de un număr de sisteme intracelulare care generează și pun la dispoziție energia. Aceste sisteme sînt de fapt mai mult convertizori decît generatori de energie.

Eucariotele animale depind exclusiv de energia chimică importată sub forma alimentelor organice din mediul înconjurător și, din acest motiv, sînt numite chemotrofe sau heterotrofe. Eucariotele vegetale, înzestrate cu cloroplaste, convertesc energia solară în energie chimică a unor compuși organici variați, ca atare neavînd nevoie să importe compuși organici din mediu; de aceea sînt numite fototrofe sau autotrofe. În ambele tipuri de celule energia chimică a metaboliților, fie de import, fie generată local, este convertită în energia chimică a legăturilor din ATP (adenozintrifosfat). Aceste legături sînt numite legături fosfat-macroergice, deoarece atunci cînd hidrolizează, eliberează o mare cantitate de energie (7,5 Kcal/legătură/mol). Legăturile fosfat-macroergice ale ATP sau ale unui derivat apropiat posedă forma de energie chimică ce poate fi prompt utilizată de toate componentele celulare implicate în reacții care necesită energie. ATP este deci moneda curentă de schimb energetic în toate celulele, iar sistemele intracelulare generatoare de energie sînt în esență producătoare și distribuitoare de ATP.

2.5.12.1. Sistemele energetice ale celulei animale

Celulele animale folosesc concomitent două sisteme generatoare de ATP: glicoliza în citosol și fosforilarea oxidativă în mitocondrii.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.12.1.1. Glicoliza

Celulele metazoarelor evoluate, inclusiv omul, folosesc *glucoza* drept prim combustibil pentru generarea energiei. Glucoza este importată din sînge sau fluidul interstițial dar poate fi generată și local în unele tipuri de celule din alți metaboliți (de exemplu din acid lactic, radicali dezaminați ai aminoacizilor) într-un proces numit *gluconeogeneză*.

Glicoliza este realizată de 10 enzime care operează o serie liniară de reacții, numită *calea glicolitică*. Primele trei enzime fosforilează glucoza și o convertesc în fructozo-difosfat. A patra enzimă — aldolaza — scindează fructozo-difosfatul în două trioze * fosforilate care, în etape ulterioare, capătă legături fosfat-macroergice și sînt folosite ca precursori imediați pentru sinteza de ATP. Produsul final al căii glicolitice este piruvatul. Dacă există destul oxigen, piruvatul devine substratul prim al fosforilării oxidative; în caz contrar, este convertit în lactat, care poate fi folosit pentru regenerarea glucozei prin gluconeogeneză.

Glicoliza *generează patru molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză prelucrată*, dar de vreme ce două molecule de ATP trebuie folosite pentru inițierea lanțului de reacții (prin fosforilatea glucozei și fructozei), cîștigul net este de două molecule de ATP pentru o moleculă de glucoză. Două molecule ale coenzimei NAD** (nicotinamid-adenin-dinucleotid) sînt reduse în acest proces la NADH, un donor de electroni eficient ce poate fi folosit în reacțiile de reducere. NADH este de asemenea un prim donor de electroni în fosforilarea oxidativă mitocondrială.

Glicoliza nu cere oxigen. Ea se desfășoară în absența lui și în acest sens este singura sursă de ATP în celulele anaerobe ce se întîlnesc printre celulele procariote.

Toate enzimele implicate în glicoliză (și majoritatea celor implicate în gluconeogeneză) sînt proteine solubile, care funcționează ca unități independente în citosol.

Glicoliza este un proces ce risipește energie, totuși eficient: el eliberează numai 5% din energia potențială a glucozei (restul rămîne în piruvat) dar convertește aproape 40% din energia eliberată în ATP, restul fiind împrăștiat sub formă de căldură. În bioenergetică o recuperare a energiei de 40% denotă eficiență ridicată.

2.5.12.1.2. Fosforilarea oxidativă

Celulele eucariote au dezvoltat devreme în evoluția biologică un alt sistem generator de ATP care utilizează *piruvatul* ca substrat primar și deci începe acolo unde se sfîrșește glicoliza. Fosforilarea oxidativă se bazează totuși pe principii diferite: energia este eliberată din metaboliți prin oxidare în trepte și e convertită în ATP printr-un proces în care *oxidarea și fosforilarea sînt strîns cuplate.* Acest sistem îmbunătățește recuperarea energiei din glucoză, cu mai mult de un ordin de mărime și este în întregime asamblat într-un organit celular special, *mitocondria* *, prezentă în multe exemplare în celulă. Cu excepția eritrocitului matur (care se bazează în întregime pe glicoliză), toate celulele umane au mitocondrii și depind de ele pentru majoritatea nevoilor lor energetice.

---

* Trioză = monozaharid cu trei atomi de carbon.

** *Mitochondrion* (gr.) = filament-granulă.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.12.2. Mitocondriile

Mitocondriile sînt corpusculi granulari sau filamentoși, cu dimensiuni suficient de mari pentru a putea fi văzute la microscopul optic, atît în celulele vii, cît și în cele fixate și colorate. Procedee optice speciale sau colorații selective sînt necesare pentru vizualizarea lor. Ele măsoară 0,3—0,5 μm în diametru și pînă la 10 μm lungime. Observațiile efectuate asupra celulelor vii au arătat că nici forma, nici numărul mitocondriilor nu sînt stabile, ci se schimbă continuu. Mitocondriile se ramifică și fuzionează una cu alta formînd rețele mari sau, dimpotrivă, se rup în corpusculi granulari izolați, în condiții încă necunoscute în întregime. Lezarea celulei duce adesea la umflarea și fragmentarea mitocondriilor. Numărătoarea de mitocondrii are deci o semnificație limitată. Parametri cu valoare informativă mai mare sînt volumul relativ sau masa relativă a mitocondriilor. În majoritatea celulelor, volumul relativ al mitocondriilor este de aproximativ 5%, dar atinge valori mari în celulele a căror activitate care o producție mare de ATP (de exemplu hepatocitele ~ 20%; celulele musculare al miocardului ~30%).

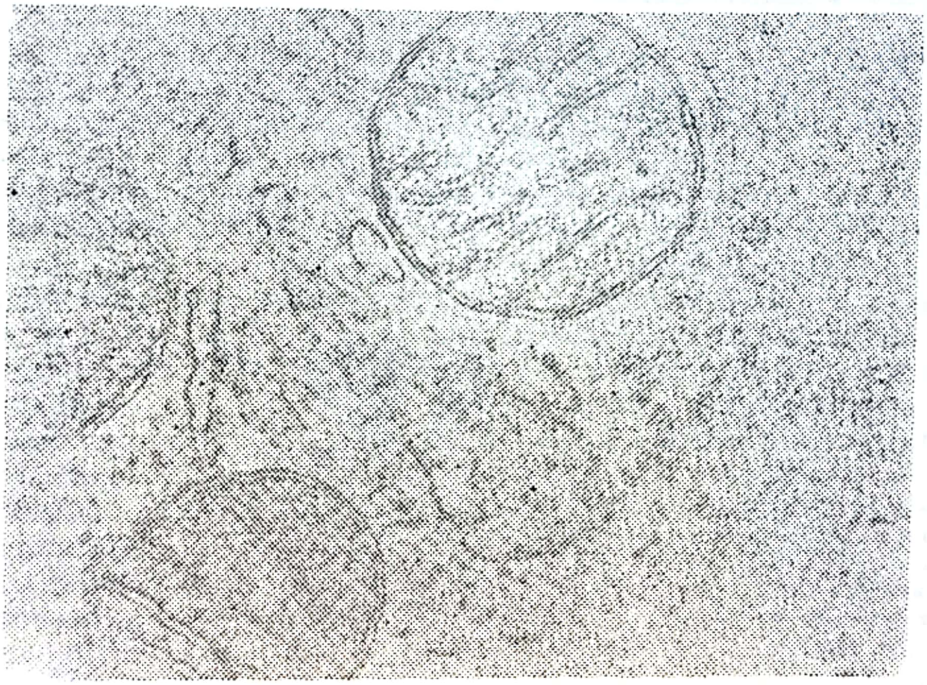


Fig. 2.32. — Mitocondrii cu creste lamelare. Electronomicrografie × 16 000.

Indiferent de variațiile de formă, toate mitocondriile au aceeași organizare de bază, vizibilă numai la microscopul electronic (fig. 2.32). Ele sînt mărginite de o *membrană mitocondrială externă* și de o *membrană mitocondrială internă*, plicaturată. Plicile, numite *cristae** *mitochondriales*, sînt falduri

Crista (lat.) = creastă, margine.

Scanned with OKEN Scanner

turtite (grosime 25 nm), în majoritatea cazurilor. *Cristae tubulare* sau de alte forme se găsesc în unele tipuri de celule (fig. 2.33). Fiecare din membranele mitocondriale are o grosime de aproximativ 6 nm și structura obișnuită a membranei „unit", adică lipidele lor polare sînt așezate în bistrat. Versantul intern al membranei interne este acoperit de *particule* mici (cu diametrul de aproximativ 9 nm), atașate de membrană printr-o tijă fină (fig. 2.34). Aceste particule ale membranei interne pot fi vizualizate optim pe preparatele cu colorație negativă *. Membrana externă este separată de membrana

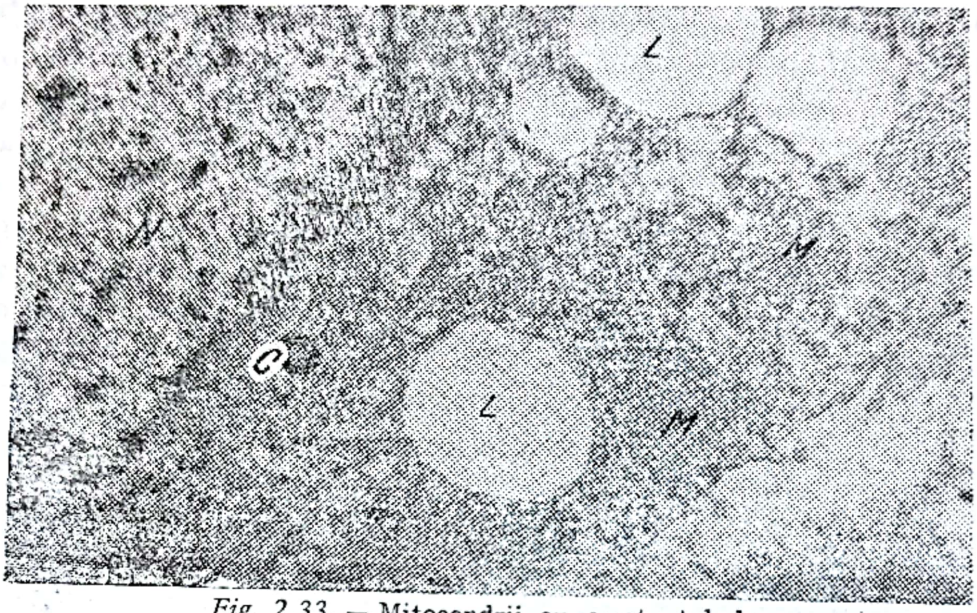


Fig. 2.33. — Mitocondrii cu creste tubulare
M—mitocondrii cu creste tubulare într-o celulă secretoare de steroizi; *L*—picătură lipidică; *C*—centriol; *N*—nucleu. Electronomicrografie × 4 200.

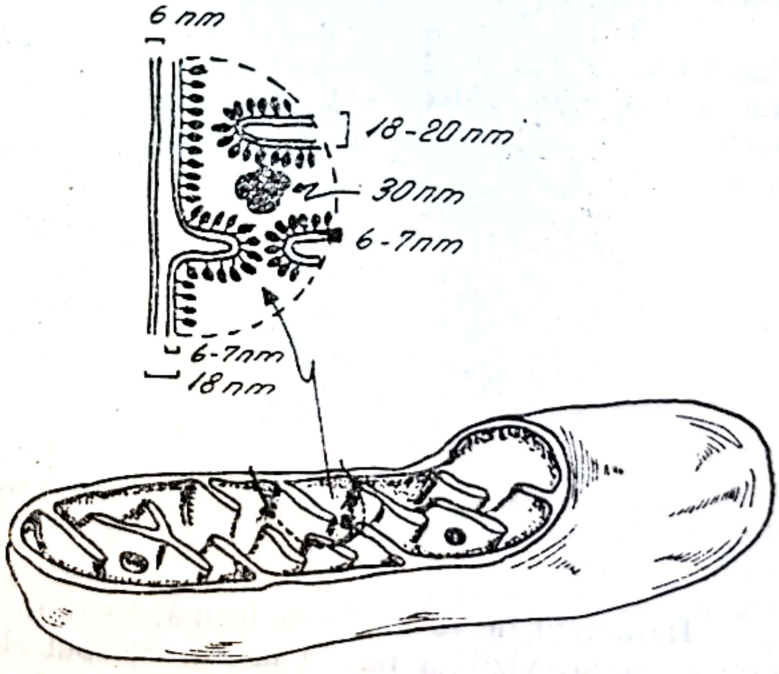


Fig. 2.34.— Schema componentelor mitocondriale. Membranele mitocondriale sînt trilaminate. Particulele membranei mitocondriale interne reprezintă un complex enzimatic ce sintetizează ATP

* Colorație negativă = metodă ce constă din imersia unor structuri biologice clare la fluxul de electroni într-o masă de colorant (de exemplu acid fosfotungstic) dens la fluxul de electroni. Se obține un preparat cu contrast înalt, ce se examinează la microscopul electronic de transmisie.

Scanned with OKEN Scanner

internă printr-un *compartiment mitocondrial extern* care se întinde ca *spațiu intracristic* în interiorul fiecărei *cristae*. Conținutul acestui compartiment are, în mod caracteristic, densitate mică. Membrana internă formează granița *compartimentului mitocondrial intern*, cu un conținut amorf de mare densitate, numit *matrice mitocondrială*. Înglobate în această matrice stau *granulele mitocondriale* (diametru 30 nm), *robozomii mitocondriali* (diametru 15 nm) și *genomul mitocondrial*, o moleculă de ADN, de obicei circulară, cu lungimea de 20 μm.

Mitocondriile sînt printre primele organite celulare izolate (în fracțiuni celulare brute) prin procedeele de fracționare celulară. Aceste procedee au fost perfecționate în cursul anilor și în prezent furnizează *fracțiuni mitocondriale* suficient de omogene, dintr-o varietate de surse (omogenate de ficat, rinichi, miocard). *Subfracțiunile mitocondriale* reprezentînd membrana internă și externă sînt și ele ușor de izolat și pot fi, la rîndul lor, subfracționate în complexe enzimatice și, în final, în componente moleculare individuale. Deci, avem la îndemînă un inventar al componentelor mitocondriale, iar localizarea majorității componentelor în mitocondrie este cunoscută.

Studiile pe fracțiunile și subfracțiunile mitocondriale au stabilit următoarele:

a) enzimele implicate în fosforilarea oxidativă sînt prezente *numai* în mitocondrii; *b) membrana mitocondrială internă* și *matricea mitocondrială* sînt cele mai importante componente structurale ale sistemului; *c)* matricea conține o serie de *complexe enzimatice* care oxidează substraturile și le reduc la o formă cerută de complexul enzimatic următor din serie.

• În prima etapă acționează: un sistem multienzimatic complex, numit piruvatdehidrogenază, care convertește piruvatul la *acetil-coenzima A (acetil-CoA)* și reduce NAD^+ la NADH; o serie de enzime implicate în *oxidarea în trepte* a acizilor grași *(beta-oxidare)* care generează de asemenea acetil-CoA; o enzimă, *glutamatdehidrogenaza*, care dezaminează glutamatul producînd alfa-ceto-glutarat (intermediar ce poate fi folosit în a doua etapă).

• În a doua etapă are loc o serie ciclică de reacții numite *ciclul acidului citric* (sau *ciclul Krebs)*, deoarece începe cu sinteza citratului (cu 6 atomi de carbon) din acetil-CoA (produsul cu doi atomi de carbon al primei etape) și oxalacetat (patru atomi de carbon, produs al ciclului însuși). Citratul este oxidat și decarboxilat într-o serie de trepte, dînd produși intermediari cu 4 și 5 atomi de carbon și generînd două molecule de bioxid de carbon pentru fiecare parcurgere a ciclului. Produsul final al ciclului, oxalacetatul, e folosit pentru a resintetiza acidul citric și cu această reacție ciclul reîncepe. La fiecare parcurgere a ciclului, dehidrogenazele care oxidează intermediarii succesivi reduc trei molecule de NAD^+ la NADH și o moleculă de FAD* la $FADH_2$. Ele generează o moleculă de GTP, dintr-un precursor chimic cu energie înaltă, ca și în glicoliză. NADH și $FADH_2$ sînt substraturile cerute de următoarea etapă în care acționează un set de enzime oxidative mitocondriale.

Toate enzimele care catalizează ciclul acidului citric sînt proteine solubile ale matricei mitocondriale, cu o excepție notabilă — succinatdehidrogenaza — care este o proteină integrală a membranei mitocondriale interne. Implicațiile funcționale ale acestei diferențe de distribuție sînt necunoscute.

* FAD = flavin adenin dinucleotid — grupul prostetic al succinat dehidrogenazei; $FADH_2$ = forma redusă.

Scanned with OKEN Scanner

• În a treia etapă acționează *lanțul mitocondrial transportor de electroni*. Acesta efectuează transportul electronilor de la NADH la $NADH_2$ la O_2 molecular. Cu o excepție, și anume coenzima Q sau ubichinona, care este un lipid, toți acești transportori sînt proteine ale membranei mitocondriale interne. Lanțul transportor de electroni începe cu *NADH-dehidrogenaza*, o flavoproteină complexă care îndepărtează doi electroni din NADH și îi transferă pe *ubichinonă*. De la ubichinonă, electronii sînt transferați în flux continuu pe o serie de *5 citocromi* (cit b; cit c_1, cit c, cit $_{a+a_3}$) la O_2 și reduc la H_2O. *Toate componentele proteice din lanț sînt proteine integrale ale membranei mitocondriale interne, cu excepția citocromului c, care este o proteină periferică, atașată de versantul extern al aceleiași membrane.*

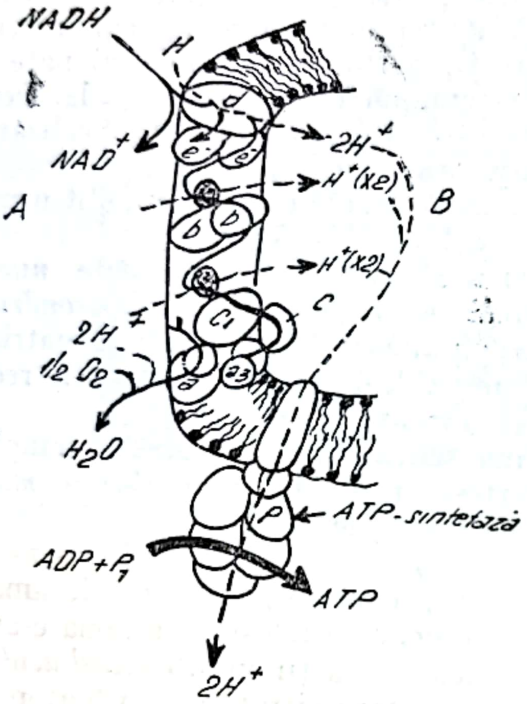


Fig. 2.35. — Schema lanțului transportor de electroni din membrana mitocondrială internă. Componentele lanțului sînt: *d* — complexul NADH-dehidrogenază; ● — — coenzima Q (ubichinonă); *b* — citocromul b; c_1 — citocromul c_1; *c* — citocromul *c*; a/a_3 — complexul citocromoxidazei; → e^- calea urmată de electroni străbate de trei ori membrana; pentru simplificare este figurat numai unul din segmentele identice ale lanțului; H^+ — calea urmată de protoni; *P* — particulă a membranei mitocondriale interne complexul ATP-sintetază; *A* — compartiment mitocondrial intern; *B* — compartiment mitocondrial extern.

Lanțul transportor de electroni face 3 bucle trecînd înainte și înapoi prin membrana internă mitocondrială. Acest aranjament facilitează elibe-rarea a 6 protoni (H^+), cîte doi în același timp, pentru fiecare pereche de electroni care se mișcă de-a lungul lanțului și creează astfel un *gradient al protonilor* și un potențial electric al membranei interne (fig. 2.35). Împreună gradientul protonilor și potențialul electric reprezintă o stocare temporară a energiei care este folosită pentru generarea ATP-ului. Protonii sînt transferați în josul gradientului înapoi în compartimentul mitocondrial intern prin canale localizate probabil în *tija* particulelor membranei interne. *Corpul* acestei particule este o *ATP-sintetază* care leagă ADP de fosfatul anorganic. Interacțiunea sa cu protonii duce la sinteza ATP-ului prin mecanisme care nu sînt încă elucidate. *Trei molecule de ATP sînt sintetizate pentru fiecare pereche de electroni ce se mișcă de-a lungul lanțului pe întreaga sa lungime, dar numai două molecule de ATP sînt produse pentru fiecare pereche de electroni care intră în lanț la ubichinonă.*

Cantitatea mare de ATP generată în mitocondrie pare să nu depindă de precursorii chimici macroergici (așa cum se întîmplă cu fosforilarea la nivelul substratului). Ea depinde de forța motrice (la figurat) a protonilor, gene-

Scanned with OKEN Scanner

rată de gradientul protonilor menționat mai sus. Acest concept relativ nou, cunoscut ca *ipoteza chimiosmotică*, dă o explicație satisfăcătoare procesului complex al fosforilării oxidative.

Așa cum este de așteptat, dacă este capabilă să mențină un gradient al protonilor, *membrana mitocondrială internă are o permeabilitate neobișnuit de scăzută*. Influxul de substrat (piruvat, acizi grași etc.) este bine controlat și se efectuează în cea mai mare parte prin *sisteme de transportori specifice*. Efluxul de ATP este cuplat cu influxul de ADP și mediat de un sistem transportor specific. Consecința este că ATP poate fi livrat de către mitocondriile celulei numai dacă ADP este disponibil în citoplasmă, adică numai dacă celula folosește ATP. Mai mult, ATP este sintetizat în mitocondrie numai dacă ADP este disponibil în matricea mitocondrială. Transportul de electroni se produce numai dacă ATP poate fi sintetizat. Respirația este deci strîns cuplată cu fosforilarea, iar factorul-cheie în sinteza de ATP este disponibilitatea ADP; altfel spus, mitocondria sintetizează ATP numai dacă celula are nevoie de ATP. Experimental, respirația și fosforilarea pot fi decuplate de o serie de compuși ca dinitrofenolul, care scade gradientul protonilor, crescînd permeabilitatea membranei mitocondriale interne.

Oxidarea completă a unei molecule de glucoză (la CO_2 și H_2O) *generează 36 de molecule de ATP:* două în timpul glicolizei în citosol, 34 în mitocondrie. Raportul 2:34 ilustrează clar importanța mitocondriilor și a fosforilării oxidative pentru energetica celulei.

În contrast cu matricea mitocondrială, *compartimentul mitocondrial extern* conține mai puține proteine, în concentrație mică. Dintre ele amintim *nucleozid difosfokinazele* (inclusiv adenilatkinaza sau miokinaza), a căror funcție este aceea de a face ADP-ul disponibil pentru sistemul de transport ATP-ADP.

Membrana mitocondrială externă diferă în multe privințe de cea internă. Ea are un număr de activități enzimatice, dar nici una nu este în legătură cu producerea ATP-ului. Cea mai bine studiată dintre ele este *monoaminoxidaza*, o enzimă implicată în inactivarea catecolaminelor. Membrana externă este foarte permeabilă și relativ rigidă. Ea nu se comportă ca o barieră de difuziune pentru moleculele mici și nu are răspunsuri osmotice. Deoarece membrana internă se comportă ca un osmometru, volumul relativ al celor două compartimente și regularitatea cristelor mitocondriale sînt influentate de activitatea osmotică a mediului înconjurător. La activitatea osmotică ridicată aspectul obișnuit al mitocondriei este înlocuit de o „stare condensată".

Ionii se acumulează în matricea mitocondrială fie prin schimb (PO_4^{2-} este schimbat cu OH^-), fie prin transport activ, cu energie furnizată de ATP. *Ca^{2+} și alți cationi bivalenți se concentrează în granulele mitocondriale* menționate. Datorită capacității lor de a acumula Ca^{2+}, *mitocondriile funcționează ca reglatori ai homeostaziei intracelulare și pot elibera Ca^{2+} în citoplasmă*, cînd este nevoie în diverse scopuri (exocitoză, contracție). Mitocondriile acumulează și *fier*, necesar pentru sinteza intramitocondrială a moleculelor hemului, gruparea prostetică a citocromilor.

În majoritatea tipurilor de celule mitocondriile sînt distribuite incidental și își schimbă continuu poziția. În alte tipuri de celule apar *asocieri persistente și caracteristice;* existența lor poate fi explicată prin necesitatea reducerii distanței pe care ATP difuzează către diferiți efectori, sau pe care substraturile trebuie să o parcurgă pînă la mitocondrii. Mitocondriile sînt

Scanned with OKEN Scanner

asociate cu falduri ale plasmalemei în celulele specializate în transportul activ de ioni, în special Na^+ și K^+ (vezi fig. 4.50). Transportul activ necesită ATP și este efectuat de ATP-aze ion-dependente care, așa cum am menționat, sînt proteine integrale ale membranei celulare. Mitocondriile se dispun strategic în jurul flagelului spermatozoidului și lîngă miofibrilele fibrelor musculare roșii. Ele se găsesc de asemenea grupate în jurul picăturilor de lipide în celulele care depind în primul rînd de oxidarea acizilor grași pentru satisfacerea nevoilor lor energetice.

2.5.13. PEROXIZOMII

Anumite oxidaze își oxidează substraturile reducînd O_2 la H_2O_2 (peroxid de hidrogen), care este redus într-o etapă ulterioară la H_2O de către *catalază*, o enzimă ce acționează fie printr-un mecanism peroxidativ, fie printr-un mecanism catalitic. Catalaza și un număr de oxidaze generatoare de H_2O_2 se găsesc în celulele animale împreună, în organite celulare speciale numite peroxizomi, deoarece în acești corpusculi catalaza reduce H_2O_2 prin mecanismul peroxidativ.

Peroxizomii au fost văzuți prima oară la microscopul electronic în celulele epiteliale ale nefronului și în hepatocite. În aceste celule ei apar sub formă de corpusculi globulari relativ mari, de 0,1 μm diametru, limitați de o membrană unică și conținînd o matrice densă, omogenă, în care este inclus, inconstant, un cristal, numit *miez*.

Peroxizomii au fost izolați în fracțiuni celulare destul de omogene și componentele lor au fost parțial caracterizate. *Membrana peroxizomală*, ca și membrana internă mitocondrială, are un transportor de carnitină care transportă acizii grași din citoplasmă în *matricea peroxizomală*. Catalaza este o componentă majoră și constantă a matricei peroxizomale care conține, în plus, o D-aminoacidoxidază și o L-alfa hidroxiaminoacidoxidază. *Miezul* este un cristal de *uratoxidază*. Toate aceste oxidaze generează H_2O_2. Recent s-a descoperit că peroxizomii pot realiza beta-oxidarea acizilor grași cuplați cu CoA. Ei conțin un set de enzime ce oxidează acizii grași, comparabil cu acela prezent în matricea mitocondrială, cu o excepție: prima enzimă a setului peroxizomal generează H_2O_2. Numărul peroxizomilor și fracțiunea de masă care îl reprezintă cresc semnificativ în hepatocitele animalelor tratate cu agenți hipolipidemici, adică droguri care reduc concentrația lipidelor în plasma sanguină. Peroxizomii produc acetil-CoA și reduc NAD^+ la NADH. Ambele produse pot fi folosite de mitocondrii pentru a genera ATP. Rolul peroxizomilor în energetica și metabolismul lipidelor din celulele normale nu este complet elucidat.

Celulele plantelor au peroxizomi mai complecși și mai versatili care conțin un sistem enzimatic, ciclul glioxilat, capabil să convertească acizii grași în glucoză. Din acest motiv ei sînt numiți *glioxizomi*.

Datorită conținutului lor în catalază, peroxizomii pot fi detectați prin reacții histochimice pentru activitatea peroxidazică. Aceste reacții evidențiază prezența unui tip de peroxizomi mici (cu diametrul de 0,1—0,2 μm), fără miez, numiți *miniperoxizomi*, existenți — practic — în toate tipurile de celule examinate pînă acum. Funcția miniperoxizomilor este încă necunoscută.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BAINTON D. F. — The Discovery of Lysosomes, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 665—765.
2. FARQUHAR M. G., PALADE G. E. — The Golgi Apparatus (Complex) 1954—1981 — from Artifact to Center Stage, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 77—103 s.
3. FELSENFELD G. — Chromatin, *Nature (Lond.)*, 1978, *271*, 115—122.
4. FRANKE W. W. și colab. — The Nuclear Envelope and the Architecture of the Nuclear Periphery, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 39 s-50 s.
5. FRIEND D. S. — Plasma-membrane Diversity in a Highly Polarized Cell, *J. cell. Biol.*, 1982, *93*, 243—249.
6. FULTON A.B. — Hoe Crowded is the Cytoplasm, *Cell*, 1982, *30*, 345—347.
7. GALL J. S. — Chromosome Structure and C-Value Paradox, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 3 s-14 s.
8. HAIMO L. T. și ROSENBAUM J. L. — Cilia Flagella and Microtubules, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 125 s—130 s.
9. INOUÉ S. — Cell Division and the Mitotic Spindle, *J. cell Biol.*, 1981, *91*, 131 s-147 s.
10. KARNOVSKY M. J. și colab. — The concept of Lipid-Domains in Membranes, *J. cell. Biol.*, 1982, *94*, 1—6.
11. KORNBERG R. D. — Structure of Chromatin, *Ann. Ref. Biochem.*, 1977, *46*, 931—954.
12. MILLER O. L. — The Nucleolus, Chromosomes and Visualization of Genetic Activity, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 15 s-27 s.
13. MORRÉ J. D. — Flow Differentiation of Membranes in Cell Compartmentation (sub red. *Nover* și colab.), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980.
14. NOVIKOFF A. B. — The Endoplasmic Reticulum. A Cytochemist View, *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1976, *73*, 2 781—2 787.
15. PALADE G. E. — Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis, *Science*, 1975, *189*, 347—358.
16. PALADE G. E. și FARQUHAR M. G. — Cell Biology in Pathophysiology (sub red. *Samy, Smith și Wengaarden)*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1981.
17. PORTER K. — The Cytoplasmic Matrix and the Integration of Cellular Function, *J. cell. Biol.*, 1984, *99*, 1, part. 2.
18. ROBERTSON D. J. — Membrane Structure, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 189 s-204 s.
19. SABATINI D. D. și colab. — Mechanism for the Incorporation of Proteins in Membranes and Organelles, *J. cell. Biol.*, 1982, *92*, 1—22.
20. SIEKEVITZ O. și ZAMECNIK P. — Ribosomes and Protein Synthesis, *J. cell. Biol.*, 1981, *91*, 53 s—65 s.
21. SPENCER M. — Nucleosome Core Structure, *Nature (Lond.)*, 1977, *269*, 7—8.
22. WEISBORD S. — Active Chromatin, *Nature (Lond.)*, 1982, *297*, 289—295.

Scanned with OKEN Scanner

MULTICELULARITATEA ORGANISMULUI UMAN

3.1. GENERALITĂȚI

Un organism deosebit de complex și relativ mare cum este corpul omenesc, este alcătuit dintr-un *număr extrem de mare* de celule, de o *mare diversitate* de tipuri (forme și funcții) și aflate într-un proces *extrem de dinamic* în timp și spațiu. Cîteva cifre sînt edificatoare. Astfel copilul nou-născut este alcătuit din cîteva mii de miliarde de celule (circa 10^{12}) iar adultul, din mai multe milioane de miliarde de celule (peste 10^{15}). Pe baza muncii sistematice depuse de histologi în ultimii 150 de ani, cele cîteva milioane de miliarde de celule din corpul omenesc pot fi împărțite, după caracterul lor morfofuncțional, în cîteva sute de tipuri diferite. În sfîrșit, este de reținut că în corpul omenesc miliarde de celule se înmulțesc continuu zi și noapte. La un adult, patru milioane de celule se divid în fiecare secundă; 350 de miliarde în fiecare zi; mai mult de 10^{14} se divid într-un an. În timp ce o celulă normală parcurge ciclul său de diviziune, survine riscul potențial ca ea să devină malignă. Cu toate acestea, majoritatea oamenilor își trăiesc viața fără să se îmbolnăvească de cancer, deși celulele lor se înmulțesc enorm în decursul existenței. Este evident că organismul uman (ca și al celorlalte viețuitoare) posedă un remarcabil sistem de control pentru a împiedica apariția unor celule aberante care ar putea deveni în final maligne. Statisticile generale, publicate în literatura curentă dau impresia generală că sistemul de control individual este relativ scăzut. Așa de exemplu, în cursul anilor 1970, în S.U.A. s-au despistat anual circa 600 000 de cazuri noi de cancer, ceea ce revine la aproximativ 1 600 în fiecare zi. O analiză mai amănunțită a acestor date ne oferă o cu totul altă perspectivă. Este probabil că la fiecare persoană cancerul a provenit de la o singură celulă aberantă. Dacă cele 215 milioane de oameni din S.U.A. au produs în fiecare zi circa 10^{20} de celule normale, atunci probabilitatea ca o anumită celulă din acestea să devieze, pentru a produce un caz de cancer, este de ordinul una la 10^{17}. Apare deci evident că organismul uman dispune de mecanisme uimitor de precise și sofisticate pentru a pune în mișcare și a controla activitatea unor populații de celule umane, extrem de diverse și deosebit de dinamice. Alcătuirea viețuitoarelor

Scanned with OKEN Scanner

superioare din numeroase celule mici apare astfel ca o prețioasă achiziție a evoluției vieții pe pămînt. Acest principiu de organizare se află la baza uimitoarei precizii cu care funcționează viețuitoarele superioare și totodată permite compensarea enormei cheltuieli de energie pe care o implică reduplicarea informației genetice în tot cursul vieții individului.

Este de asemenea uimitor că în ciuda marii lor diversități morfofuncționale, celulele ce alcătuiesc corpul omenesc sînt strîns interelate, fiind descendenți recenți ai unei singure celule inițiale — ai ovocitului fecundat. Descendență comună implică *un genom* (totalitatea genelor) *comun*. Așadar, toate celulele corpului uman, ca regulă, sînt *genetic identice* însă *fenotipic diferite* — unele sînt specializate sub formă de țesut muscular, altele în țesuturi nervoase, altele în sînge, în țesuturi conjunctive sau în diferite tipuri de țesuturi epiteliale. Specializarea celulelor depinde nu de pierderea sau achiziția de noi gene ci de *schimbări* în expresia genetică (a substratului ereditar comun) sau a *fenotipului*. Diferitele tipuri de celule sînt aranjate în grupe (populații) precis organizate, cu o structură generală foarte bine definită. Toate caracterele morfofuncționale sînt *determinate* de secvențele de ADN din genom, care este reprodus în fiecare celulă în parte, și sînt *modelate* de factori epigenetici, ca relațiile (schimburile) intercelulare, matricea extracelulară etc. Fiecare celulă trebuie să acționeze pe baza acelorași instrucțiuni genetice, care trebuie însă interpretate cu precizie, la timpul și în circumstanțe date, pentru a-și putea juca rolul cuvenit, propriu, în societatea multicelulară a organismului uman.

Organismele multicelulare, oricît ar fi de complexe, trebuie să se formeze pe calea unui repertoriu relativ restrîns de activități celulare. Celulele cresc și se divid *(proliferează)*, *migrează*, se *recunosc* și *aderă* (între ele sau la matricea extracelulară), se *diferențiază* și *mor*.

3.2. DIFERENȚIEREA ȘI CONTROLUL EXPRESIEI GENETICE

3.2.1. CE ESTE DIFERENȚIEREA ?

Procesul prin care celulele cu aceeași informație genetică ajung să difere considerabil una de alta, chiar cînd se află în micromedii similare, este denumit *diferențiere*. El implică două lanțuri de evenimente paralele: dezvoltarea unor componente și structuri specifice care se perfecționează treptat și pierderea opțiunilor de a se dezvolta pe alte căi.

3.2.2. UNITATEA GENOMULUI ȘI DIVERSITATEA EXPRESIEI SALE

Corpul omenesc este alcătuit dintr-un număr relativ limitat de *tipuri* de celule net deosebite calitativ — circa 200, în conformitate cu clasificarea histologică tradițională.

Diferitele tipuri de celule se disting în esență, deoarece, pe lîngă numeroase proteine „comune" pe care le posedă toate, fiecare mai sintetizează un set diferit de proteine specializate. Așa este keratina în celule epider-

Scanned with OKEN Scanner

mice, hemoglobina în globulele roșii, enzimele digestive în celulele intestinale, cristalina în celulele cristaliniene și așa mai departe. Se pune întrebarea dacă la această situație se ajunge simplu, de exemplu, în celulele cristalinului, prin pierderea genelor de hemoglobină, de keratină etc. și reținerea celor de cristalină, sau eventual dacă ele și-au amplificat selectiv numai genele cristaliniene. Există numeroase dovezi că nu așa se petrec lucrurile și că toate tipurile de celule conțin un genom complet, același care se găsește și în oul fecundat.

Transplantul de nuclei în oul fecundat de amfibii oferă cel mai puternic argument că genomul însuși rămîne neschimbat, în ciuda schimbărilor produse în cursul diferențierii. Așa de exemplu, transplantarea nucleului preluat de la o celulă intestinală a mormolocului de broască sau de la o hematie (hematia de broască are un nucleu heterocromatic) în oul nefecundat enucleat, duce la formarea unei broaște normale.

Fenotipul celular este consecința directă a acumulării tuturor proteinelor pe care celula respectivă este capabilă să le sintetizeze pentru a îndeplini funcțiile vitale esențiale precum și pe cele specifice. Genomul uman nu exprimă decît între 40 000 și 200 000 de proteine diferite, ceea ce reprezintă doar o mică fracțiune din capacitatea sa teoretică. Celula nervoasă din creierul uman este expresia maximă a genomului său, necesitînd punerea în funcțiune a unei cantități mult mai mari de material genetic pentru a specifica proprietățile sale vitale decît oricare alt tip de celulă din corp. S-au putut identifica cel puțin 170 000 de diferite tipuri de molecule de ARNm în celula nervoasă din creierul de șobolan, care codifică probabil un număr egal de proteine diferite.

3.2.3. CONTROLUL EXPRESIEI GENETICE

Cu toate că sinteza și acumularea de proteine este sensibilă la control în numeroase faze ale dezvoltării sale, pe linia fluxului informațional AND→ ARN→ proteină (vezi capitolul 2), se acceptă în general că controlul inițierii transcripției ARN-ului mesager este faza cea mai importantă în determinarea fenotipului.

Organismele eucariote sînt deosebit de complexe. În cazul eucariotelor superioare, celulele trebuie să se diferențieze în organe, fiecare alcătuit din mai multe tipuri de celule specifice, iar aceste organe trebuie să fie capabile să răspundă la stimulii ambianți, în conformitate cu starea fiziologică a întregului organism. Baterii de gene trebuie să fie activate ca răspuns la unii stimuli și răspunsurile la aceiași stimuli trebuie să fie diferite pentru celulele din țesuturi diferite. Ca urmare, atît în cursul dezvoltării cît și la oranismele superioare adulte, celulele trebuie să dispună de seturi de gene speciale pentru a controla intrarea în funcție a diferitelor țesuturi în diferitele lor faze de activitate. Aceasta implică două niveluri distincte de control genetic; unul asupra stadiului de diferențiere (atît în timp cît și ca tip) iar cel de al doilea privind răspunsul unor gene speciale la stimulii mediului ambiant. Manifestările fenotipice ale celor două niveluri de control al diferențierii sînt cunoscute ca efect al *determinării celulare* și respectiv, al *poziției celulare*. Este de presupus că o anumită genă conține secvențe capabile de a fi activate într-un anumit tip de celulă, în

Scanned with OKEN Scanner

conformitate cu istoria liniei celulei respective, și o altă secvență care se activează ca răspuns la semnalele primite din exterior.

Descoperirea unui scurt segment de ADN denumit homeoboxă, etapă crucială în elucidarea bazelor moleculare ale diferențierii celulare și ale dezvoltării organismelor superioare. Unul din cele mai mari mistere ale biologiei contemporane îl constituie înțelegerea mecanismelor prin care informația liniară, cuprinsă în lanțul de ADN al unei singure celule—celula-ou—, poate genera în cursul dezvoltării embrionare, un organism tridimensional specific și extrem de complex cum este cazul organismelor superioare, inclusiv al omului. Fiecare organ al omului adult îndeplinește anumite funcții și este alcătuit din țesuturi specializate; țesuturile, la rîndul lor, sînt compuse din celule specializate. Celulele specializate exprimă numai o mică fracțiune din marele potențial genetic al omului fecundat. Ce fracțiune anume, din potențialul total, se manifestă într-un anumit tip de celule — depinde de genele care sînt activate și de cele care sînt inhibate. Fiecare tip de celulă este caracterizat printr-un set specific de gene active și inactive care fac obiectul unor schimbări succesive, pe parcursul dezvoltării celulelor respective. Întrucît genomul organismelor superioare cuprinde aproximativ 50 000 de gene, este puțin probabil ca fiecare genă să fie reglată individual. De circa 30 de ani s-a presupus că genele ar putea fi reglate în grup, prin intermediul unor gene „reglatoare", care ar controla acțiunea fiecărui grup. Cu toate că o astfel de schemă a apărut ca logică, identificarea genelor reglatoare s-a dovedit a fi foarte dificilă.

În ultimii ani au fost identificate cîteva gene reglatoare care controlează dezvoltarea embrionară. Evident, pentru ca dezvoltarea să se desfășoare corect, atît succesiunea în timp a fazelor dezvoltării cît și organizarea spațială a țesuturilor embionare trebuie să fie foarte precis reglate. Genele identificate recent afectează ambele funcții. În esență, a fost identificat un grup de gene pe cromozomi de *Drosophila*, denumite *gene homeotice*, capabile să activeze alte gene, în diferite regiuni ale corpului. Aceste gene par să aibă o importanță fundamentală pentru dezoltarea tuturor speciilor de animale, inclusiv a omului. Denumirea de „genă homeotică" derivă din faptul că aceste gene sînt responsabile de mutațiile de tip homeotic observate în anii '50 de geneticianul E.B. Lewis la *Drosophila*, mutații care constau în apariția unor organe de aspect normal dar care nu se află la locul potrivit (picioare în loc de antene sau în loc de aripi) sau în număr anormal etc.

Cercetările recente au arătat că una din caracteristicile genelor homeotice constă în existența unui mic segment de ADN comun. Acest segment, denumit *homeoboxă**, conferă genelor care-l conțin capacitatea de a regla activitatea altor baterii de gene.

Atunci cînd o genă ce conține homeoboxa este transmisă într-o proteină, homeoboxa produce un lanț de aminoacizi capabil să se lege de dublul helix al ADN-ului altor gene. Această însușire a peptidei (lanțului de aminoacizi) sintetizează de homeoboxă se datorează conținutului mare în aminoacizi bazici. Prin legarea proteinei (sintetizată de homeoboxă) de ADN-ul unei anumite gene, aceasta din urmă poate fi activată sau inhibată.

Este deosebit de important de semnalat faptul că secvențele de ADN ale homeoboxelor sînt similare la toate speciile de organisme (cel puțin la toate animalele segmentate), de la viermi pînă la om (aceasta înseamnă că ele

* *Homeoios* (gr.) = similar

Scanned with OKEN Scanner

își conservă identitatea de cel puțin 500 de milioane de ani, de cînd s-au despărțit vertebratele de nevertebrate). Este probabil că homeoboxa constituie o cheie importantă pentru descifrarea mecanismelor moleculare care stau la baza diferențierii și dezvoltării organismelor superioare, inclusiv a omului.

3.2.4. MENȚINEREA STĂRII DE DIFERENȚIERE

Deși diferite tipuri de celule diferă foarte mult în numeroase privințe, toate au unele necesități de bază. Toate necesită un *suport mecanic*, adesea reprezentat de o țesătură complexă de molecule ale *matricei extracelulare*. În plus, aproape toate tipurile de celule necesită un aport de sînge din care-și procură substanțele nutritive și în care sînt eliberați produșii rezultați din activitatea celulară. De asemenea, celulele stabilesc *comunicații intercelulare* caracteristice, primesc stimuli pe calea sistemului nervos și mesageri chimici de la sistemul endocrin sau de la alte tipuri de celule.

Fiecare țesut este astfel un amestec intricat de diferite tipuri de celule care rămîn diferite unele de altele, care trebuie să rămînă diferite unele de altele deși coexistă în același mediu; aceasta datorită *memoriei celulare*.

Celulele pigmentare din retină își păstrează caracterele chiar și în culturile repetate *in vitro*. Matricea extracelulară secretată de celulele înseși ajută la menținerea gradului de diferențiere celulară.

Interacțiunea celulă-celulă poate modela starea de diferențiere. Unele structuri se mențin numai datorită unei interacțiuni continue dintre componentele celulare. Așa de exemplu, mugurii gustativi, care sînt diferențieri ale epiteliului bucal, dispar dacă sînt denervați și reapar după reinervare.

Unii agenți chimici — de exemplu cei ce produc metilarea ADN-ului — pot cauza alterări radicale ale diferențierii.

3.2.5. INTERRELAȚIA CITOPLASMĂ–MATERIAL GENETIC

Există dovezi din ce în ce mai numeroase că fluxul informațional unidirecțional de la ADN la ARN și apoi la proteină este contrabalansat printr-un contracurent de la ARN la ADN. Posibilitatea transmiterii fluxului informațional de la ARN la ADN a fost stabilită încă de prin anii 1970, cînd s-a raportat că virionii retrovirușilor conțin *revers-transcriptaza*. Timp de circa 10 ani s-a crezut că virușii tip ARN sînt singura „nișă" în biologie care poate utiliza calea de transcriere, de la ARN la ADN.

În ultimii ani, concepția că transcrierea inversă este un mecanism exclusiv retroviral, s-a infirmat. Mai întîi s-a dovedit că virușii hepatitei B, ca și cei ai mozaicului conopidei (care sînt viruși de tip ADN), prezintă ARN-uri intermediari care sînt transcriși invers în ADN. În al doilea rînd, au fost descoperite *pseudogenele modelate*. Acestea sînt segmente de ADN aparent funcționale, organizate similar cu ADN-ul complementar (cADN), fiind copii ale ARNm celular; ele au 3 poli (A), le lipsesc intronii și conțin mutații care-i fac incapabili să codifice proteine funcționale. Pseudogenele își au originea în transcrierea inversă. Unele segmente scurte de ADN de la mamifere, care se repetă foarte frecvent, sînt înrudite cu genele modelate. Aceste segmente — al căror prototip este reprezentat de segmentele *Alu* din genomul uman —

Scanned with OKEN Scanner

se prezintă ca adevărate copii ale ARN-ului celular. Se consideră de asemenea că ele provin prin transcripție inversă.

A treia categorie de dovezi pentru transcrierea inversă neretrovirală este reprezentată de o clasă particulară de elemente transpozabile, prezente la numeroase tipuri de eucariote, care sînt organizate similar retrovirusurilor. Acești *retrotranspozomi*, ca și provirușii retrovirusurilor, sînt integrați în ADN-ul cromozomial cu scurte segmente repetitive la ambele capete, au lungi regiuni terminale repetitive la ambele capete (LTR), au locuri de legare pentru ARNt — la extremitarea stîngă, au lungi segmente deschise pentru citirea planurilor (ORF), au un ORF care se poate manifesta numai prin ocolirea unui codon terminal, precum și multe alte caractere similare retrovirusurilor.

Celulele vertebratelor conțin o clasă de retroviruși denumiți *particule de tip A*, care pot fi considerate retrotranspozomii acestor tipuri de celule. Particulele A sînt neinfecțioase și se află în celulă pentru că sînt capabile să înmugurească în membranele intracelulare și nu în membrana plasmatică. Ele au o transcriptază inversă activă și sînt prezente, sub forma lor provirală, în cantități de circa 0,3% din ADN cromozomial. Mai mult, ele sînt capabile să „transpună" noi segmente în ADN, așa cum s-a dovedit cu mutantele imunoglobulinei kappa, produse ca urmare a inserției unui provirus tip A.

În concluzie, în prezent trebuie considerat că transcripția inversă este o modalitate principală de *remodelare* (reorganizare) a genomului la toate speciile de animale — de la om și pînă la insecte sau la drojdia de bere. Aproximativ 10 procente din genomul a numeroase specii provin prin transcrierea inversă (vezi oncogenele).

3.3. PROLIFERAREA CELULARĂ ȘI POPULAȚIILE DE CELULE

3.3.1. CE ESTE PROLIFERAREA CELULARĂ ?

Termenii de „ciclu", „*turnover*" sau „proliferare celulară" sînt adeseori utilizați unul în locul celuilalt. „Ciclul" și „*turnover* celular" trebuie utilizați pentru stările de autoreînnoire (vezi capitolul 2). *Proliferarea celulară* implică înmulțirea celulară în sensul de schimbări în număr, de creșterea cantitativă a unei populații de celule.

În esență, relațiile între proliferare și ciclul celular sînt relații între cauză și efect. Spunem că o populație de celule proliferează atunci cînd ritmul ciclurilor celulare îl depășește pe cel al degenerărilor și morții. Proliferarea și ciclul celular fiind procese cu importanță majoră în organismul uman (atît pentru biologia cît și pentru patologia tisulară), ni se pare util să reținem cîteva date recente privitoare la mecanismele moleculare care stau la baza acestui extrem de complex fenomen vital. O mare parte din studiile asupra ciclului celular au fost consacrate definirii succesiunii în timp a principalelor evenimente ale ciclului. În esență desfășurarea lor a condus la concluzia că ciclul celular constă în cel puțin patru faze funcționale distincte. Sinteza ADN-ului survine în *faza S*, mitoza în *faza M*, acestea fiind separate de două perioade de timp în care au loc procese de pregătire a sintezei ADN și, respectiv, a mitozei —

Scanned with OKEN Scanner

așa-numitele faze G_1 și, respectiv, G_2. Rao și Johnson au arătat printr-o elegantă serie de experiențe de fuzionare a celulelor aflate în perioade diferite ale ciclului celular, că stadiul mitotic al unei celule poate induce fragmentarea membranei nucleare și condensarea cromozomilor în nucleul prelevat de la celulele nemitotice; totodată s-a arătat că o celulă aflată în faza S poate induce replicarea ADN-ului și în molecula provenită de la o altă celulă aflată în faza S_1 (nu însă și în cele din faza G_2). Aceste experiențe sugerează că există o *ierarhie funcțională* la nivel molecular a celor patru faze ale ciclului celular — de la faza dominantă la cea dominată: $M > G_2 > S > G_1$ — care este inversă derulării ciclului celular (vezi cap. 2).

În plus, cercetările au arătat că anumiți factori din faza G_1 inhibă mitoza.

Așa de exemplu, populațiile de celule care se specializează pentru a îndeplini anumite funcții în organism, se află într-o poziție particulară, deoarece, în general vorbind, aceste celule *nu* se află într-un ciclu activ. De regulă, funcțiile speciale sînt efectuate de acele celule care rămîn o *perioadă mai îndelungată în faza* G_1. Astfel, pentru a atinge un înalt nivel de specializare, în mod curent, celulele trebuie să-și sacrifice capacitatea de a prolifera, ceea ce face ca anumite tipuri de celule, foarte înalt diferențiate, să-și părăsească ciclul celular fără a reveni niciodată.

De asemenea, într-un anumit țesut, nu toate celulele sale se specializează; unele țesuturi își mențin populații de celule relativ nespecializate, care sînt capabile încă să se mai dividă pentru a reînnoi populațiile de celule specializate funcțional. Unele din celulele nespecializate nu se află în ciclul activ, deoarece ele au ieșit din faza G_1 și rămîn în afara ciclului, pînă cînd sînt rechemate pentru a genera noi celule care să înlocuiască celulele specializate sau uzate. Celulele neangajate în parcurgerea ciclului sînt denumite celule în *stadiul* G_0, pentru a sugera că ele se află *în afara* ciclului. Celulele din faza G_0 au totuși: *a*) capacitatea de a reintra în ciclu la nevoie și *b*) capacitatea nealterată de a se divide.

Este foarte mult adevăr în afirmația că specializarea celulară este de regulă însoțită de pierderea capacității de proliferare. Așa cum s-a afirmat, celulele specializate de obicei nu se află în ciclul activ. În unele cazuri, totuși, pierderile severe sau creșterea puternică a cererii determină fie proliferarea celulelor specializate, fie, de obicei, stimularea celulelor precursoare să se înmulțească mai rapid pentru a face față noilor nevoi.

Factorii care controlează proliferarea și ciclul celular sînt deosebit de complecși și puțin cunoscuți. Importanța cunoașterii acestor mecanisme este ușor de sesizat atît pentru biologia tisulară cît și pentru patologia celulară.

În concluzie, atît experiențele de transplantare a nucleilor în celulele enucleate cît și specializarea celulară sau prezența, în unele populații, a celulelor aflate în faza G_0, dovedesc cu claritate că *citoplasma are o acțiune dominantă asupra nucleului, în cursul desfășurării ciclului celular.*

a) *Ciclul celular este reglat de un sistem oscilator de factori citoplasmatici autonomi.* Cercetări foarte recente (Newport și Kirschner — *Cell*, 1984, *37*, 731—742) au permis identificarea și purificarea unei proteine cu greutatea moleculară de 100 KD, extrasă inițial din citoplasma ovocitelor de broască. Această proteină a fost denumită *factorul de accelerare a maturării* (FAM). Activitatea FAM este *oscilantă*, și anume — maximă în mitoză și absentă în faza S. Concentrația acestui factor oscilează și în celulele enucleate, ceea ce

Scanned with OKEN Scanner

dovedește că el face parte efectiv dintr-un aparat ce reglează ciclul celular în mod *autonom*, față de elementele ce constituie substratul acțiunii lor (de exemplu membrana nucleară și cromozomii). Astfel, caracterul dominant al mitozei față de celelalte faze ale ciclului celular se datorează prezenței în concentrație mare a FAM. Absența activității FAM caracterizează faza S, în care are loc sinteza ADN. Este posibil ca în trecerea de la M la S să fie implicați și alți factori (încă neidentificați) care au drept efect, printre altele, inactivarea FAM. Pe de altă parte, a mai fost identificat un al doilea factor, denumit *factorul citostatic* (FCS), care intervine pentru a opri ciclul celular în metafază (adică în mitoză). Acțiunea factorului citostatic este anihilată de Ca^{2+}.

Conceptul de ciclu celular reglat prin oscilațiile unor factori citoplasmatici autonomi, sugerează existența unui nivel de reglare mai presus de ciclu, care apare ca o secvență de procese ce dovedesc interdependența reacțiilor care stau la baza proliferării celulare. Este foarte probabil că ciclul celulelor somatice este o complexare și o extindere a mecanismelor întîlnite în ciclul celulelor embrionare iar această complexare implică intervenția unor procese sofisticate inhibitorii de *feed back*, destinată unei mai bune integrări a ciclului celular în procesul de proliferare și unei mai bune adaptări la diferitele condiții fiziologice.

b) Tranziția celulelor din interfază în mitoză este un proces complex care presupune condensarea cromatinei, ruperea învelișului nuclear, dezagregarea citoscheletului interfazic și formarea fusului mitotic. Studiile de transplant nuclear și de fuziune celulară dovedesc că această tranziție se află sub controlul citoplasmic. Cercetările efectuate *in vitro*, privitor la acțiunea factorului de accelerare a maturării asupra diferitelor tipuri de celule somatice, au permis clarificarea unor procese moleculare care stau la baza trecerii de la interfază la mitoză. Astfel s-a reușit să se demonstreze că FAM poate induce evenimentele inițiale ale mitozei în celulele somatice, provocînd condensarea cromatinei și ruperea membranei nucleare atunci cînd este adăugat într-un mediu cu celule aflate în interfază. Aceste evenimente survin rapid și sincron, ca răspuns la FAM, și sînt suprimate cînd activitatea FAM este blocată. La 15 minute de la adăugarea în mediul de cultură a FAM, proteinele structurale majore ale laminei nucleare, laminele A și C sînt hiperfosforilate. Acțiunea de fosforilare este urmată, 30 minute mai tîrziu, de depolimerizarea treptată a laminei nucleare. Astfel se dovedește că FAM induce sinteza și că fosforilarea proteinelor laminei precedă dezagregarea laminei nucleare și declanșează apoi ruperea membranei nucleare.

c) Un alt punct în care se manifestă controlul asupra proliferării celulare este reprezentat de trecerea celulelor din faza G_0/G_1 în faza S. Este de așteptat ca în această fază să se petreacă anumite modificări biochimice care să fie răspunzătoare de acest control și ca ritmul intrării celulelor în faza S să depindă de aceste modificări biochimice. Se știe de cîțiva ani că limfocitele umane stimulate prin mitogeni (cum sînt fitohemaglutinina sau concavalina A, în prezența factorilor serici) intră în faza S numai după o perioadă pregătitoare de circa 26 ore. Ritmul intrărilor în faza S a celulelor stimulate de mitogeni, care este foarte constant, constituie o dovadă că perioada pregătitoare exercită un control asupra fazei S.

S-a constatat de asemenea că în urma stimulării prin mitogeni, în perioada pregătitoare au loc procese biochimice complexe ca: activarea fluxului

Scanned with OKEN Scanner

de ioni, sinteze de proteine speciale, activarea metabolismului nucleotizilor ciclici, expresia unor gene specifice etc.

Cercetările recente (Hall și colab. — *J. cell Biol.* 1984, *99*, 1 814—1 821) au dovedit că apariția unor *proteine de 60 kd* în primele ore de la activarea fitohemaglutininei asupra limfocitelor umane, constituie principalul răspuns specific care poate fi asociat cu stimularea intrării limfocitelor în faza S.

d) Ciclina și statina, două proteine identificate în celulele proliferative și, respectiv, neproliferative. Recent, cîteva rapoarte au semnalat prezența unei proteine de 360 000 D numai în acele celule ale unei anumite populații, care proliferează activ însă nu și în partenerele lor neproliferative. Inițial, proteina a fost descoperită cu ajutorul serului unor pacienți cu lupus eritematos sistemic și a fost identificată ca fiind un antigen nuclear celular cu o mare activitate proliferativă. Ulterior, s-a constatat că această proteină este prezentă într-o mare varietate de tipuri celulare proliferative și a fost considerată fie ca *antigenul nuclear al proliferării celulare*, fie ca *ciclină*.

De asemenea, în ultimul timp (Wang E., 1985) a fost identificată o proteină de 57 000 D, denumită *statină* — prezentă în nucleul celulelor neproliferative și absentă în cele proliferative. Mai întîi, statina a fost localizată în nucleul fibroblastelor senescente. Ulterior, s-a putut demonstra că apariția statinei poate fi indusă și în fibroblastele tinere a căror capacitate de proliferare a fost stopată ca urmare a confluenței culturilor. În sfîrșit, s-a putut dovedi că această proteină apare în diferite tipuri de celule neproliferative aflate în faza G_0/G_1 și că ea este localizată în cisterna perinucleară.

Cercetări preliminare arată că ciclina și statina sînt prezente alternativ în cursul tranziției de la stadiul proliferativ la cel neproliferativ și vice-versa.

În concluzie, este foarte probabil ca ciclina să reprezinte un tip de proteină care apare numai în celulele proliferative iar statina să fie prezentă numai în celulele neproliferative (atît în cele îmbătrînite cît și în cele tinere dar aflate în faza G_0/G_1).

3.3.2. POPULAȚIILE DE CELULE

Pe baza evaluării cineticii lor, diferitele tipuri de populații celulare ce constituie organismele multicelulare, pot fi sistematizate în trei grupe principale:

a) **Celulele statice** sau *descrescătoare* cuprind populațiile de celule ajunse într-un stadiu avansat de specializare și dezvoltare, care, în mod obișnuit, își pierd sau își limitează capacitatea de proliferare iar adeseori, treptat, scad în număr. În această categorie intră neuronii, celulele musculare, ovocitele etc.

b) **Celulele în tranzit** — celulele provenite din populații de celule precursoare — au o existență bine delimitată, relativ scurtă, în corpul uman. Timpul de tranzit (durata vieții celulelor respective) este determinat în mod obișnuit de procesul de „sinucidere" prin maturare, în cursul căruia celulele își pierd capacitatea de proliferare înainte de a fi eliminate. Procesul de maturare conferă de obicei populațiilor celulare respective caractere structurale „de vîrstă" sensibile la microscop (de exemplu spermatocitele, keratinocitele, mielocitele, normoblastele etc.). Unele din aceste celule sînt capabile de divi-

Scanned with OKEN Scanner

ziune (spermatocitele etc.), altele nu mai sînt capabile de diviziune (spermatidele, hematiile etc.).

c) **Celulele-stem** sînt tipurile de celule *capabile de automenținere extensivă* (cu capacitate de autoreînnoire) care *persistă pe parcursul întregii* (sau aproape) *vieți a indivizilor**. Potențialul de diferențiere este o proprietate numai a unor tipuri de celule-*stem* dar nu comportarea lor generală. Termenul de „extensiv" presupune în esență capacitatea nealterată de a se autoreînnoi prin proliferare. Așadar, orice tip de celule din organism, care sînt capabile să-și păstreze numărul prin proliferare pe parcursul vieții individului, în ciuda pierderilor fiziologice sau patologice (fie prin moarte, imobilizare sau diferențiere), sînt definite ca celule-*stem*.

Trebuie remarcat că sistematizarea de mai sus are un caracter aproximativ și că ea se bazează în multe cazuri îndeosebi pe evaluarea unor diferențe cantitative mai degrabă decît pe caractere calitative nete.

În timpul dezvoltării embrionare, populații întregi de celule tranzitorii apar și dispar în scopul de a edifica populațiile statice și respectiv *stem* care compun organismul complet dezvoltat.

3.3.3. CONCEPTUL DE "CELULĂ–STEM"

Termenul de „celulă-stem" este adeseori utilizat vag de numeroși autori. Cel mai deseori noțiunea de celulă-*stem* este utilizată în sensul de *celulă-sușă sau tulpină a altor tipuri de celule*. Foarte frecvent termenii de precursor, sușă, tulpină, progenitor și stem sînt considerați sinonimi, și aceasta în detrimentul clarității. Astfel, populații de celule-tranzit pot fi sușe sau precursoare pentru alte populații de celule-tranzit. De exemplu, celulele-sușe sensibile la eritropoietină care dau naștere la normoblaști. De asemenea, pot exista celule-*stem* care nu sînt precursoare (sau sușe) pentru alte tipuri de celule. De exemplu unele hepatocite sînt considerate celule-*stem* pentru că în condiții speciale sînt capabile să prolifereze; de asemenea cardiomiocitele auriculare sînt capabile să prolifereze în condiții speciale.

O altă confuzie constă în descrierea celulelor-*stem* ca celule *nediferențiate*. Greșeala este flagrantă, deoarece în afară de zigot, fiecare celulă din organismul uman este mai mult sau mai puțin diferențiată. Unele celule-*stem* pot să se diferențieze în continuare, dînd astfel naștere la descendenți cu un grad de diferențiere mai avansat. Acești descendenți pot să fie obiectul unor modificări treptate, cunoscute sub denumirea de maturare. Diferențierile ulterioare, pe care le-am menționat deja, sînt specifice, spre exemplu, celulelor-*stem* hematopoietice dar nu și hepatocitelor care își mențin și ele numărul relativ constant (prin proliferare) în cursul întregii vieți a organismului uman. În esență, toate tipurile de celule-*stem* trebuie considerate celule diferențiate, numai că unele sînt capabile de a se angaja (sub acțiunea unor stimuli specifici) în noi procese de diferențiere.

---

* Definiția conceptului este propusă de grupul de lucru comun al „Union Internationale Contre le Cancer" (UICC) și de „International Cancer Research Workshop" (ICREW) de la Villejuif, Franța, 27.02.1978.

Scanned with OKEN Scanner

Celulele-*stem* prezintă și alte caracteristici ce le oferă un comportament biologic și patologic diferit de al celulelor-tranzit cu care sînt asociate în organizarea diferitelor tipuri de țesuturi din organism. Printre aceste cracteristici trebuie menționat faptul că într-un anumit țesut ele reprezintă o *populație minoritară*, că *reacționează la radiații și la droguri* diferit de celulele-tranzit cu care sînt asociate, au un *ritm circadian special* și un *ciclu biologic mai mare* decît celulele-tranzit, *captează selectiv timidina* (au un „pool" specific pentru timidină, care le permite să o încorporeze în ADN într-un timp foarte scurt) și, probabil, sînt capabile să *segregheze cele două lanțuri de ADN („vechi" și „nou")* pentru a le putea distribui prin mitoză în celule-fiice, cu destinații diferite (cele cu ADN-ul „vechi" sînt destinate autoreînnoirii populației *stem*, iar cele cu ADN-ul „nou" se desprind în această populație, devin susceptibile de a parcurge noi forme de diferențiere și se angajează în populațiile de celule-tranzit).

În epiteliul seminal — practic singurul tip de celule-*stem* identificabile după caracterele lor morfologice — celulele-*stem* (spermatogoniile „prăfoase") reprezintă circa 1—2% din celulele-tranzit (aproximativ $2—3 \times 10^4$ în testiculul unui șoarece).

Celulele-*stem* de măduvă osoasă manifestă un mare grad de pluripotență și o autoreînnoire intensă. Ele mai sînt desemnate și sub denumirea prescurtată CFU-S (de la denumirea din limba engleză: *S*plenic *C*olony *F*orming *U*nit — termenul *unit* este preferat celui de *cell*). Celula-*stem* CFC-S reprezintă 0,4%, adică 1 la 250 din celulele-tranzit din măduva osoasă.

În țesuturile epiteliale de acoperire (ca și în epiteliul seminal) celulele-*stem*, spre deosebire de celulele de tranzit, rămîn puternic ancorate de membrana bazală. În cripta intestinală se află circa 16 celule-*stem* care-și păstrează permanent topografia în vecinătatea gîtului criptei. În epiderm ele sînt mai puțin de 10% din celulele stratului bazal și rămîn atașate de membrana bazală, în vreme ce restul celulelor acestui strat se detașează de membrana bazală în măsura în care se angajează în procesul de maturare. În epiteliul amigdalian, probabil 3% din celulele bazale sînt celule-*stem*.

Heterogenitatea celulelor leucemice sau din tumori este bine dovedită prin metode histopatologice, citochimice și imunologice. Utilizarea metodei „clonării" a dovedit că circa 1—5% din celulele leucemice sînt celule-*stem*, iar majoritatea sînt celule tranzitorii. Aplicarea aceleiași metode la studiul populațiilor de celule din diferite tipuri de tumori a dus la concluzii similare. Faptul că celulele-*stem* responsabile de creșterea continuă constituie o minoritate atît în leucemii cît și în tumori, are o semnificație deosebit de importantă. Aceasta înseamnă că majoritatea analizelor biochimice sau biologice efectuate asupra tumorilor vizează populația celulară majoritară, de tranzit, care nu este semnificativă pentru însușirea de bază a tumorii, și anume *creșterea* (datorită celulelor-*stem*, minoritare). Conceptul ne ajută să înțelegem unele succese terapeutice prin radioterapie și îndeosebi prin chimioterapie, atunci cînd aspectul general al masei tumorale încă nu pare să indice o remisiune pe termen mai lung. De asemenea, este de presupus că acest concept (de celulă-*stem* tumorală) va dobîndi o deosebită importanță în elucidarea mecanismelor moleculare care stau la baza acțiunii oncogenelor.

Scanned with OKEN Scanner

3.4. FACTORII DE CREȘTERE MITOGENI

Factorii de creștere au în prezent statutul pe care-l aveau vitaminele cu mai mult de un secol în urmă: încă insuficient cunoscuți, se știe că au un rol fundamental în multiplicarea, diferențierea și supraviețuirea celulară, inclusiv în cursul embriogenezei, în controlul homeostaziei tisulare și în repararea țesuturilor lezate. Există foarte probabil un număr mare de astfel de factori, dintre care numai cîțiva sînt mai bine cunoscuți, alții — în curs de caracterizare, iar alții — fără îndoială că nu au fost încă identificați.

În cele ce urmează ne vom referi numai la *factorii de creștere mitogeni*, fără a-i menționa pe cei ai liniei limfoide și hematopoietice și lăsînd deoparte, de asemenea, așa-numiții factori de supraviețuire, ca și pe cei neurotrofici (aceștia din urmă vor fi prezentați în capitolul 9, consacrat țesutului nervos). Vom trece în revistă întîi cîteva din proprietățile factorilor de creștere mitogeni mai bine cunoscuți, pentru a putea prezenta în continuare cîteva dintre proprietățile studiate *in vitro* și a clasifica în final semnificația lor fiziologică sau fiziopatologică.

3.4.1. CE SE ÎNȚELEGE PRIN FACTORI DE CREȘTERE ?

În prezent nu se poate da decît o definiție operațională a acestor factori, bazată îndeosebi pe proprietățile lor stabilite *in vitro*. Factor de creștere este o moleculă proteică izolată din diferite tipuri de țesuturi, care, adăugată la o cultură de celule ce dispune de toate elementele nutritive, induce un proces de proliferare celulară netă în cultura respectivă, în comparație cu culturile de celule-martor.

3.4.2. PRINCIPALII FACTORI DE CREȘTERE

Principalii factori de creștere au fost identificați în diferitele tipuri de țesuturi. În ultimii 20 de ani au fost extrase și identificate un mare număr de polipeptide (de proveniență foarte heterogenă ca: plasma sanguină, glanda submaxilară, creierul, hipofiza, cartilajul etc.) al căror efect principal este acela de a declanșa proliferarea celulelor de anumite tipuri.

3.4.2.1. Factorul de creștere epidermic (EGF — Epidermal Growth Factor)

S. Cohen remarcă în 1960 că un extract de glandă salivară de șoarece mascul injectat zilnic la șoarecii nou-născuți induce deschiderea precoce a pleoapelor, deschidere determinată de îngroșarea epidermului, ca urmare a proliferării celulelor sale. Prin purificarea extractului s-a putut dovedi că acest efect se datorează unei polipeptide care a fost denumită „factor de creștere epidermic".

Scanned with OKEN Scanner

Molecula EGF are o greutate de 16 045 daltoni și un punct izoelectric de 4,5. Ea se compune din 53 de secvențe de aminoacizi și structura sa secundară prezintă trei punți disulfidice. EFG este activ în cantitate de cîteva nanograme de proteină pe mililitru de mediu de cultură.

Urogastrona, un hormon inhibitor al secreției gastrice a HCl care a fost purificat din urina umană, este probabil echivalentul uman al EGF de șoarece. Structura primară a urogastronei indică o omologie cu EGF de 70%. Clonarea genetică a EGF de șoarece și de om arată că precursorul EGF este o proteină cu G.M. de 133 000 daltoni.

3.4.2.2. Factorul de creștere derivat din plachetele sanguine (PDGF – Platelet Derived Growth Factor)

PDGF, identificat mai întîi în serul sanguin, a fost extras ulterior din plachetele sanguine umane. Acțiunea sa mitogenă a fost testată pe diferite tipuri de celule în cultură și este activă în concentrații similare celor de EGF. Molecula sa se compune din două lanțuri polipeptidice de 14 și respectiv 17 000 de daltoni, legate între ele prin punți disulfidice și cu un pH de 9,8. PDGF-ul există sub două forme, cu greutăți moleculare apropiate — PDGF I și PDGF II. Studiul structurii primare al unuia din cele două lanțuri proteice a arătat o mare asemănare cu proteina sintetizată de o oncogenă a unui retrovirus de maimuță (gena *sis* a „Simian Sarcoma Virus"). Această descoperire deschide un nou cîmp de investigație asupra legăturilor dintre oncogene și factorii de creștere.

În afară de acești doi factori — EGF și PDGF — foarte bine caracterizați și purificați chimic, mai există un număr de alți factori de creștere extrași din alte țesuturi, a căror purificare este mai dificilă.

3.4.2.3. Factorul de creștere a fibroblastelor) (FGF – Fibroblast Growth Factor)

Există sub două forme, una extrasă din hipofiză, cu o greutate moleculară de 13 600 daltoni și punctul izoelectric de 9,3, iar cealaltă extrasă din creier, asemănătoare primei.

3.4.2.4. Factorul de creștere a celulelor endoteliale (ECGF – Endothelial Cell Growth Factor)

A fost izolat din hipotalamus; are o greutate moleculară între 17 000 și 25 000 daltoni și un pH între 4 și 6.

3.4.2.5. Factorul de creștere astrocitar (AGF – Astrocytes Growth Factor)

A fost izolat din extractul de creier. Are o acțiune proliferativă și asupra maturării astrocitelor în cultură.

Scanned with OKEN Scanner

3.4.2.6. Factorul de creştere extras din ochi (EDGF – Eye Derived Growth Factor)

A fost extras din diferite părţi ale globului ocular (retină, iris, umoarea vitroasă şi coroidă). Are greutatea moleculară de 17 000, pH de 4,5 şi diferă de FGF sau EGF nu numai prin proprietăţile chimice, ci şi prin acţiunea sa mitogenă asupra unor celule-ţintă.

3.4.2.7. Factorul de creştere extras din cartilaj (CDGF – Cartilage Derived Growth Factor)

Este o polipeptidă cationică de 16 400 daltoni, cu efect mitogen asupra condrocitelor şi fibrocitelor *in vitro*.

În afară de factorii de creştere menţionaţi, a mai fost identificat un grup de *factori de creştere secretaţi de celule în culturi*, fie normale, fie transformate. Dintre aceştia tebuie reţinuţi *factorii de creştere a tumorilor* (TGF = = *Tumor Growth Factor*). Sub această denumire sînt cuprinşi un mare număr de factori de creştere secretaţi de celulele tumorale, care sînt polipeptide cu greutate moleculară mică, stabili în mediu acid, capabili să stimuleze reversibil creşterea în colonii a celulelor *ne*transformate. Aceşti factori au fost identificaţi în lichidul de la suprafaţa celulelor tumorale cultivate, precum şi în extrasele din celulele transformate sub acţiunea agenţilor chimici sau a virusurilor tumorigene.

3.4.3. MECANISMUL DE ACŢIUNE IN VITRO A FACTORILOR DE CREŞTERE

Principalele noastre cunoştinţe privitor la mecanismul de acţiune a factorilor de creştere se datorează cercetărilor asupra EGF şi PDGF (singurii factori suficient de purificaţi pentru efectuarea unor asemenea studii). În esenţă, efectul asupra diferitelor celule-ţintă se datorează interacţiunii factorilor cu receptorii *specifici* de la suprafaţa celulelor.

Existenţa receptorilor specifici la suprafaţa celulelor-ţintă a fost demonstrată atît pentru EGF cît şi pentru PDGF (cîte 40 000 şi 400 000 pe o celulă). Se pare că există două tipuri de receptori — unii de mare afinitate, alţii de slabă afinitate). Receptorii sînt glicoproteine membranare cu greutate moleculară de 170 000 daltoni, pentru EDF, şi de 164 000 pînă la 185 000 daltoni pentru PDGF.

Ca urmare a interacţiunii dintre factori şi receptori, se declanşează o cascadă de evenimente celulare care precedă răspunsul mitogen. Acestea includ stimularea transportului ionic, activarea fosfatidilinozitolului, degradarea ATP, modificări ale suprafeţei celulare, inclusiv endocitoza, activarea glicolizei, inducţia ornitincarboxilazei, activarea ARN şi a sintezei proteice, iniţierea sintezei de ADN şi, în final, diviziunea celulară.

Evident că la inducerea acestor evenimente participă şi alţi agenţi interni sau externi, diviziunea celulară fiind un proces celular general. Totuşi unele efecte par să fie specifice pentru factorii de creştere.

Scanned with OKEN Scanner

3.4.3.1. Fosforilarea receptorului

În primele minute de la legarea factorului de creștere de receptorul său, este activată tirozinkinaza membranară. Această enzimă fosforilează reziduul de tirozină de pe receptorul EGF sau al celei de PDGF. S-a dovedit că activitatea kinazică se datorează unui mic fragment de pe lanțul polipeptidic al receptorului însuși. În consecință, receptorul glicoproteic transmembranar are trei proprietăți: de receptor (pentru factorul de creștere), tirozinkinazică și de substrat pentru această enzimă.

3.4.3.2. Endocitoza complexului receptor + factor de creștere

Complexul receptor + factor de creștere se grupează la suprafața membranei în caveole „acoperite". Acestea sînt apoi internalizate, prin endocitoză, în vezicule „acoperite". Enzimele endocitate fuzionează ulterior cu lizozomii primari (vezi paragraful privitor la transportul transepitelial din capitolul 4).

3.4.3.3. Factori de competență și factori de progresiune

Noțiunile de „factori de competență" și „factori de progresiune" au fost introduse ca urmare a experiențelor care au arătat că celulele fibrocitare din sușă 3T3 expuse timp de numai 30 minute la PDGF, devin „competente" pentru replicarea ADN-ului lor și pentru intrarea lor în diviziune. În acest stadiu nici extragerea PDGF, nici adăugarea de anticorpi anti-PDGF nu împiedică derularea ciclului celular, dacă în mediul de cultură există un factor de progresiune cum este somatomedina C sau insulina. Efectul cooperativ a două tipuri de factori de creștere (al factorilor de competență cum este PDGF și al factorilor de progresiune cum sînt insulina și somatomedina C) a fost pus în evidență în numeroase sisteme. PDGF singur nu permite ca celulele să iasă din faza G_0 (adică din faza de repaus) și să treacă în faza S (de replicare a ADN) a ciclului biologic celular. De asemenea somatomedina C nu acționează (nu are efect) decît asupra celulelor activate de către un factor de competență (cum este PDGF).

Trebuie notat că mecanismul descris mai sus nu este general, deoarece EGF este în același timp și factor de competență, și factor de progresie. Semnalăm de asemenea efectul paradoxal al EGF asupra unor celule cu foarte mulți receptori (ca în cazul celulelor din sușa A 431), care sînt stimulate cînd EGF este în concentrație foarte mică și inhibate, cînd concentrația este mare.

3.4.3.4. Controlul ciclului celular

Cercetările efectuate cu PDGF au permis punerea în evidență pe fibroblaste a existenței unor secvențe de gene inductibile prin PDGF (0,1—0,3% din genele transcrise). În stare de repaus ARN-mesager este puțin abundent (circa 70—100 de copii pe celulă), numărul tipurilor de molecule de ARN-m crescînd la 700—3 000 de copii după stimularea PDGF.

Scanned with OKEN Scanner

3.4.4. EFECTUL ÎN VIVO AL FACTORILOR DE CREȘTERE

Cunoștințele de care dispunem în prezent referitor la acțiunea *in vivo* a factorilor de creștere sînt fragmentare.

3.4.4.1. Rolul și efectul in vivo al EGF

Așa cum arătam, inițial s-a dovedit că *in vivo* EGF are efectul de a accelera deschiderea ochilor și de a crește dinții la șoarecele nou-născut, iar urogastrona — de a inhiba secreția de HCl după stimularea prin histamină la om. Ulterior s-a descoperit că EGF de șoarece are și el acțiune inhibitorie asupra secreției de HCl (ca urogastrona), precum și că urogastrona are un efect similar cu al EGF cînd este administrat la șoarece.

Cu toate caracterele chimice comune și cu toate că urogastrona și EGF au proprietăți fiziologice similare, locul de sinteză a acestor factori nu pare să fie unic. Numai la șoarecele mascul (nu și la femelă) s-a demonstrat că EGF este stocat și parțial sintetizat în celulele tubulare excretorii din glanda submaxilară și că această sinteză este endogen-dependentă. Cu toate acestea, cantitatea de EGF circulant este aceeași atît la șoarecele mascul cît și la cel femel iar ablația glandelor salivare nu afectează această concentrație.

La om, glandele salivare și glandele Brunner din duoden par să fie sediul sintezei dar sursele cele mai importante rămîn urina (60 ng/ml), laptele (50—80 ng/ml) și saliva (5—17 ng/ml).

Ablația glandelor salivare la șoarece induce totuși întîrzierea creșterii, o pieredere în greutate de 10—12%, fără să afecteze fecunditatea.

În laptele uman, concentrația în EGF este constantă în tot timpul lactației și al ciclului circadian, ceea ce indică un transport pasiv al EGF în circulația sanguină.

EGF a început să fie utilizat ca agent cicatrizant în ulcerele corneene umane și se crede că este un agent regenerator al mucoasei intestinale.

3.4.4.2. Efectele în vivo ale TGF

A fost identificată prezența TGF cu greutate moleculară mare (20 000—30 000), pe lîngă TGF normal (de 6 000—8 000), în urina bolnavilor de cancer diseminat.

3.4.4.3. Rolul PDGF în patogenia aterosclerozei

Rolul PDGF în patogenia aterosclerozei a fost incriminat recent. Aplicarea unor noi metode în biologia celulară la culturile de celule, împreună cu tehnicile de microchimie și cele de inginerie genetică vor duce la progrese rapide în domeniul factorilor de creștere.

Scanned with OKEN Scanner

3.5. ONCOGENELE

3.5.1. GENERALITĂȚI

Oncogenele reprezintă anumite porțiuni din anumite gene care determină transformarea canceroasă a acestora, fiind responsabile de neoplazierea celulei. Ele nu sînt altceva decît genele celulare normale, care controlează creșterea și diviziunea celulară, dar care au fost alterate în funcția lor de diferiți factori mitogeni sau de virusuri.

Virusurile sînt microorganisme ce conțin în genomul lor fie molecule de ARN, fie molecule de ADN capabile să sintetizeze unul sau mai multe tipuri de proteine. Genomul viral este împachetat într-o teacă numită *capsidă*, formată din unul sau mai multe straturi de proteine. La multe virusuri capsida proteică este înconjurată și de o membrană ce conține lipide și proteine aranjate asemănător plasmalemei celulare.

Virusurile se pot multiplica numai în interiorul celulei în care pătrund. Atît structura genomului viral cît și modul de replicare a virusurilor diferă mult, în funcție de tipurile virale. Infecția virală este însoțită de liza celulei în care a pătruns virusul, urmată apoi de eliberarea de particule virale. Unele virusuri pot fi integrate în cromozomii celulelor-gazdă, unde se vor multiplica odată cu diviziunea celulei respective.

Virusurile pot perturba controlul creșterii și diviziunii celulare prin *mutageneză inserțională* care presupune integrarea ADN-ului viral în genomul celulei-gazdă, sau prin *oncogene* (mai mulți loci genetici), care sînt direct sau indirect responsabili de neoplazierea celulei-gazdă.

Multe virusuri determină tumori la numeroase vertebrate, începînd de la reptile și pînă la maimuțe. Sînt cunoscute și virusuri specifice, care pot induce transformarea canceroasă la unele celule umane.

3.5.2. RETROVIRUSURILE

Primul virus tumoral identificat a fost virusul sarcomului Rous, al cărui component genetic este o moleculă de ARN lungă de aproximativ 9 000 de nucleotide. În prezent se cunosc multe virusuri tumorale cu genom ARN, numite ARN-virusuri, *retrovirusuri*, leucovirusuri sau oncornavirusuri.

Retrovirusurile determină infecții virale care duc simultan la eliberarea neletală a unor produși virali progenitori la suprafața celulei și provoacă modificări permanente ale celulei infectate, pe care o transformă malign (fig. 3.1).

Pentru multiplicarea retrovirusurilor este necesară sinteza de ADN mediată de acțiunea unei enzime numită *ADN-polimeraza* sau *revers-transcrip-*

Scanned with OKEN Scanner

taza, prin care lanțurile de ARN viral sînt transcrise în molecula de ADN. Datorită intervenției acestei enzime, ARN-virusurile se numesc și retrovirusuri.

Revers-transcriptaza formează inițial o copie ADN a moleculei virale ARN, apoi un al doilea helix de ADN, ce generează o dublă copie ADN a

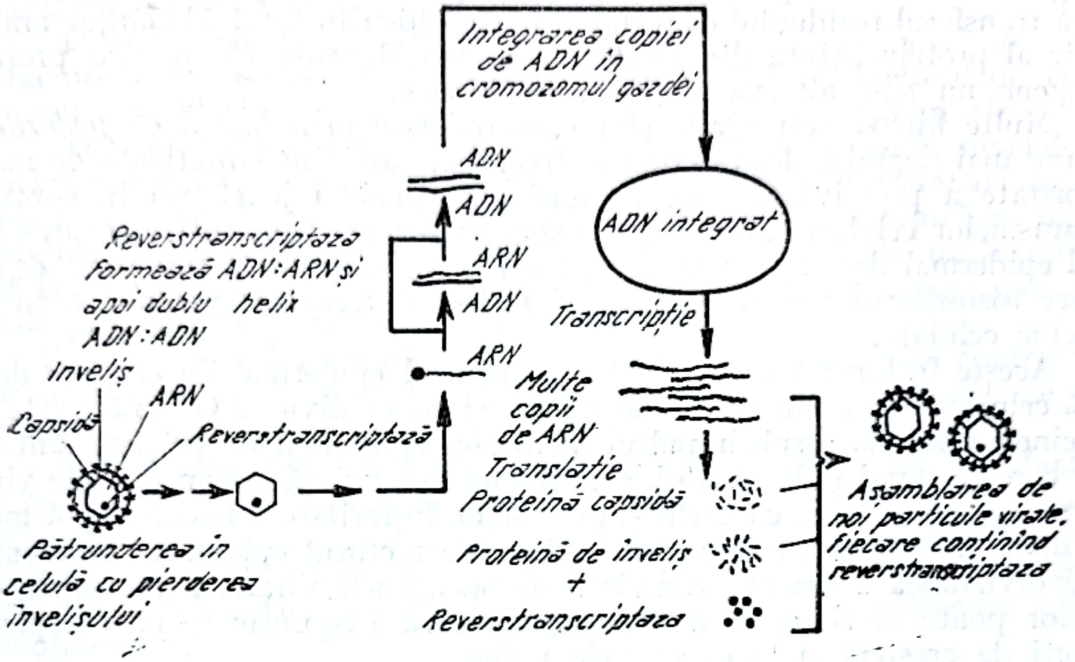


Fig. 3.1. — Ciclul vital al retrovirusurilor.

genomului ARN. Integrarea acestui dublu helix de ADN sau *„provirușI"* în cromozomul celulei-gazdă, proces catalizat enzimatic, este necesară pentru sinteza de noi molecule virale ARN.

3.5.3. VIRUSURILE TUMORALE ADN

Virusurile tumorale ADN au genomul constituit din molecule ADN. Această clasă cuprinde foarte multe *papovavirusuri* mici (exemplu: virusul SV 40 al maimuței, virusul poliomei șoarecelui, fiecare cu aproximativ 5 000 de perechi de baze) sau *adenovirusuri* mai mari (exemplu: virusul Epstein-Barr, un virus herpes-*like* implicat în producerea la om a limfomului Burkitt).

Ca și retrovirusurile, ADN-virusurile transformă celulele infectate prin inserția materialului genetic viral în ADN-ul cromozomial al celulei-gazdă. Ca o consecință, genele virale devin parte integrantă a genomului-gazdă, se multiplică odată cu el și vor fi prezente în întreaga populație clonală ce rezultă din diviziunea celulei infestate.

Pînă în prezent se cunosc peste 20 de oncogene virale, dintre care unele acționează în nucleu, altele în citoplasmă și altele la suprafața membranei celulare. Acțiunea lor se desfășoară în trei moduri:

Scanned with OKEN Scanner

3.5.4. MECANISMELE DE ACȚIUNE A ONCOGENELOR

3.5.4.1. Fosforilarea

Fosforilarea substraturilor proteice și fosfolipidice prin produsul genetic V—Src (gena virală ARN), care este o *proteinkinază*, catalizează transferul reziduului de fosfat al nucleozid-trifosfatului la lanțul aminoacidic al proteinei-țintă din celula-gazdă. S-a dovedit că și alte proteine oncogene nu sînt altceva decît proteinkinaze.

Multe kinaze retrovirale sînt caracteristice prin faptul că *fosforilează tirozina* mai degrabă decît serina și treonina, care sînt sintetizate de marea majoritate a proteinkinazelor. Fosforilarea tirozinei joacă rol în controlul mecanismelor celulare normale: de exemplu legarea proteinei, care este factorul epidermal de creștere, de receptorul lui specific de la suprafața celulei, induce fosforilarea tirozinei în însăși molecula receptor, precum și în alte proteine celulare.

Aceste fosforilări determinate de factorul epidermal de creștere determină celula să iasă din starea de repaus și să se dividă. O bună parte din proteinele fosforilate sub impulsul factorului epidermal de creștere sînt aceleași care răspund și la fosforilarea tirozinei stimulată de oncogenele virale. Aceste fapte sugerează că aceleași procese de fosforilare a tirozinei pot media atît diviziunea celulară normală, inițiată de factorul epidermal de creștere, cît și diviziunea anormală stimulată de oncogenele virale. Fosforilarea proteinelor poate oferi astfel o explicație pentru răspunsurile pleiotropice la factorii de creștere și la oncogenele virale.

3.5.4.2. Inițierea sintezei de ADN

Inițierea sintezei de ADN, care mult stimulată, constituie unul din componentele inevitabile ale fenotipului neoplazic.

3.5.4.3. Reglarea transcripției

Reglarea transcripției se realizează prin unele proteine transformate, dintre care unele codificate de oncogene. Printre primele proteine transformatoare în nucleu, codificate de oncogene, au fost situate antigenele T ale adenovirusurilor și papovavirusurilor, dar nucleul conține el însuși un număr substanțial de proteine cu rol modificator. Cele mai multe dintre acestea din urmă sînt situate în matricea nucleară. Aceste proteine transformatoare, stimulatoare ale transcripției promotorilor celulari, vor produce fenotipuri neoplazice. Ele participă la organizarea cromatinei active fie ca stabilizatori ai unor factori celulari, care interacționează cu activatori facilitînd acțiunea acestora, fie ca contracaranți ai unor represori celulari.

În transformarea neoplazică, una sau mai multe gene virale (oncogene) vor fi integrate în genomul celulei-gazdă, proces în care proteinkinazele virale joacă un rol important. Deoarece creșterea celulară este reglată în cadrul unui circuit ce se extinde de la suprafața celulei pînă în nucleu, oncogenele pot exemplifica acest traseu intersectîndu-l prin: *factorii de creștere, receptorii pentru factorii de creștere, transductorii* din celula care deter-

Scanned with OKEN Scanner

mină *procesul de fosforilare a proteinelor, factorii efectori nucleari* care răspund la semnalele mitogene.

Circuitul nu reprezintă evenimente într-o cascadă simplă. În primul rînd se declanșează căi paralele la acțiunea unor stimuli mitogeni, iar în al doilea rînd circuitul va include căi convergente. Virusurile tumorale, factorii de creștere și receptorii lor, ca și alterarea genetică sînt implicate în transformarea neoplazică.

Date recente leagă acțiunea oncogenelor de fiecare nivel de acțiune a factorilor de creștere (factorul epidermal de creștere, factorul de creștere derivat din plachetele sanguine, factorul de creștere insulin-*like*).

Aceasta include similarități structurale și funcționale la nivelul moleculelor factorilor de creștere, la nivelul receptorilor membranari ai factorilor de creștere și posibila implicare a oncogenelor în sistemul mesager intracelular ce induce sinteza factorilor de creștere. Mai mult, unele oncogene pot determina producerea endogenă de factori de creștere, care apoi stimulează producția celulară după un model de autocrinie.

Proliferarea celulelor diploide normale în culturi stă sub controlul factorilor de creștere exogeni. În absența propriilor mitogeni celulele se opresc în faza G_1/G_0.

Celulele transformate traversează ciclul celular, în absența factorilor de creștere exogeni. Informații privind mecanismul molecular de transformare au fost obținute prin studiile genelor transformatoare (mai mult de 20 de oncogene au fost identificate fie ca parte integrantă a genomului virusurilor tumorale, fie ca secvențe transformatoare ale ADN-ului celulelor tumorale).

Retrovirusurile desfășoară rapid recombinarea între genomul virusului non-transformator și secvența genei celulare transductoare (protooncogene).

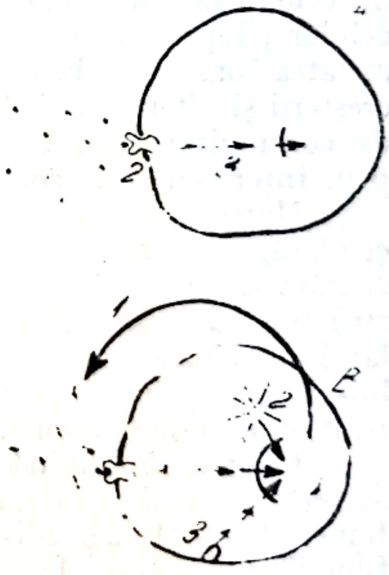


Fig. 3.2. — Mecanismul mitogenezei în celula normală și în celula transformată:

A — reprezentarea schematică a căii mitogene indusă de factorul de creștere în celula normală: *1* — factorul de creștere; *2* — receptorul factorului de creștere; *3* — sistemul mesager intracelular care transmite semnalul mitogen de la receptor la nucleu; *B* — reprezentarea schematică a căii mitogene alterate din celula transformată; *1* — producerea endogenă de factori de creștere care stimulează celula după model autocrin; *2* — producerea de factori care mimează activitatea funcțională a receptorului factorului de creștere; *3* — producerea de factori care reglează sistemul mesager intracelular.

Funcția protooncogenelor este necunoscută, deși se pare că participă la reglarea proliferării celulare. Acest fapt este susținut de date recente care arată că anumiți produși ai oncogenelor (proteine transformatoare, ca și omologii lor din celula normală) sînt legați de anumite căi mitogene ale celulei-gazdă (fig. 3.2).

Scanned with OKEN Scanner

Independența factorului de creștere și creșterea autonomă a celulelor transformate pot fi datorate unor elemente ce controlează calea mitogenă normală, respectiv factorul de creștere însuși, receptorul de membrană care servește ca transductor al semnalului extracelular sau al sistemului de semnale intracelulare, care în final inițiază sinteza de ADN și diviziunea celulară.

Existența unei relații între receptorii factorilor de creștere și oncogeni este marcată și de faptul că ei au o puternică omologie de aminoacizi, iar mulți receptori ai factorilor de creștere sînt proteine transformatoare echipate cu activitate *tirozinkinazică*. Astfel tirozinkinaza care se găsește de obicei în cantitate redusă în celula normală (mai puțin de 0,1% din fosfatul legat de proteine este atașat la tirozină în celulele normale), este în schimb asociată cu proliferarea celulară indusă de factorii de creștere și de retrovirusuri în celula transformată.

La om, malignizarea de etiologie virală, nedovedită încă deplin, prezintă totuși unele probe destul de evidente pentru unele cancere cum ar fi: limfomul Burkitt, carcinomul nazofaringian, carcinomul colonului, leucemia cu limfocite T, neuroblastomul, retinoblastomul.

3.6. MATRICEA EXTRACELULARĂ

3.6.1. GENERALITĂȚI

În organismele multicelulare celulele sînt înconjurate de matricea extracelulară, pe care ele însele o secretă și o delimitează în diferite compartimente. Noțiunea de matrice extracelulară definește în termeni de structură mediul intern. Compoziția și structura diferitelor domenii sînt controlate de celule, iar matricea extracelulară, la rîndul ei, influențează procesele celulare, reprezentînd suportul structural al fenomenelor ce realizează integritatea organismului: adezivitatea, comunicarea intercelulară, controlul creșterii și diferențierii, homeostazia. Matricea extracelulară se află în relație de continuitate sau chiar continuitate moleculară cu membrana celulară, prin intermediul glicocalixului.

Matricea extracelulară are o *componentă fluidă*, esențială pentru viața celulară, formată din apă și molecule solubile, și o *componentă solidă*, reprezentată de molecule insolubile și de complexe macromoleculare ordonate în structuri. Gradul de fluiditate a matricei extracelulare variază în limite foarte largi de la un compartiment la altul și în limite mai restrînse în cadrul aceluiași compartiment, componentele solubile și cele insolubile fiind în permanent schimb de molecule. Diferitele compartimente comunică selectiv între ele.

Celulele determină conținutul diferitelor compartimente eliberînd prin secreție, în mediul extracelular, o mare varietate de molecule, mai ales proteine, glicoproteine, glicozaminoglicani și proteoglicani. Unele dintre ele au funcții integrative. De exemplu, proteinele plasmei sanguine, în exclusivitate proteine solubile *, secretate mai ales de hepatocite și plasmocite, func-

* Coagularea sîngelui este un proces ilustrativ pentru tranziția ce are loc frecvent între moleculele solubile și cele insolubile. În condiții controlate de celulele endoteliale, de trombocite și de factorii plasmatici ai coagulării, monomerii de fibrinogen solubil se clivează proteolitic, formînd monomeri solubili de fibrină, capabili să polimerizeze în fibrină insolubilă.

Scanned with OKEN Scanner

ționează în reglarea presiunii osmotice, transportul metaboliților, în răspunsul imun etc. Datorită travaliului endoteliului vascular, toate aceste proteine sînt prezente și în fluidul interstițial și în limfă.

O largă varietate de tipuri celulare (mezenchimale, epiteliale) secretă diferite tipuri de molecule în interstițiul țesuturilor, unele solubile iar altele insolubile, ce edifică structuri. Acestea pot fi identificate microscopic ca fibre de colagen și elastice, membrane bazale și substanța fundamentală.

Fibrele au rolul de suport mecanic al țesuturilor (printre altele), iar membranele bazale reprezintă structuri ce sînt situate la polul bazal al epiteliilor sau formează învelișuri pentru o serie de celule înconjurate de matrice, cum sînt: celulele musculare, celulele Schwann, celulele conjunctive, unde se continuă cu glicocalixul. (Pentru detalii asupra fibrelor, vezi țesutul conjunctiv; membrana bazală a epiteliilor este descrisă la țesutul epitelial.)

3.6.2. PRINCIPALELE COMPONENTE ORGANICE ALE MATRICEI EXTRACELULARE

3.6.2.1. Colagenul

Colagenul de diferite tipuri este secretat de celulele conjunctive, epiteliale, musculare sau nevroglice, sub forma unor molecule glicoproteice precursoare — procolagenii. După descărcarea secreției în mediul extracelular, moleculele sînt modificate prin proteoliză enzimatică parțială, procolagenii fiind convertiți în forme de colagen (tropocolagenii) capabile să polimerizeze fie în fibrile de colagen, ce rămîn ca atare în substanța fundamentală sau intră în componența fibrelor, fie în rețele fibrilare ce intră în componența membranelor bazale. Există cel puțin cinci tipuri de colagen ce intră în componența fibrilelor (tipurile I, II și III), a membranelor bazale (tipurile IV și V) sau au alte localizări în substanța fundamentală (vezi tabelul 5.I).

3.6.2.2. Glicoproteinele

Glicoproteinele ce se găsesc în matricea dintre diferitele tipuri de celule, ca și în serul sanguin, au fost intens studiate în ultimul timp. Ele conțin lanțuri oligozaharidice legate covalent de lanțurile polipeptidice. Lanțurile oligozaharidice, lineare sau ramificate, pot conține între 2 și 12 radicali monozaharidici, de mai multe tipuri, de obicei în succesiune nerepetitivă. Cel mai adesea monozaharidul terminal este acidul sialic (N-acetilneuraminic), încărcat electronegativ.

Grupările oligozaharidice sînt atașate covalent, printr-un monozaharid specific, de un aminoacid specific din lanțul polipeptidic. S-au descris trei tipuri de legături. În unele glicoproteine (de exemplu imunoglobulinele) lanțul oligozaharidic este atașat prin N-acetil D glucozamina de azotul amidic al radicalului de asparagină din lanțul polipeptidic. În alte glicoproteine (de exemplu glicoproteinele din mucus) legătura se produce între N-acetil D galactozamina și grupul hidroxil din serină sau treonină. În a treia categorie (de exemplu colagenul) lanțul oligozaharidic este atașat de grupul —OH al radicalilor de hidroxilizină.

Scanned with OKEN Scanner

Printre glicoproteinele cu localizare extracelulară se numără glicoproteinele plasmei sanguine (fibrinogen, albumine, imunoglobuline, proteinele de grup sanguin), formele circulante ale unor hormoni glicoproteici (FSH, TSH, HCG), glicoproteinele matricei extracelulare.

Glicoproteinele matriceale sînt sintetizate de celule pe calea cunoscută: reticul endoplasmic rugos, aparat Golgi și apoi exocitate în mediul extracelular. Ele au putut fi identificate în diferite compartimente celulare, unde se află în diferite stadii ale biosintezei, ca și în mediul extracelular.

Pe de altă parte, aceste molecule demonstrează o funcționalitate multiplă. Ele pot fi integrate în membrane ca proteine intrinseci sau extrinseci, funcționînd ca receptori de membrană, pot fi adsorbite la suprafața membranelor, mediind interacțiunea acestora cu diferite molecule matriceale, sau participă în matrice la legăturile ce se stabilesc între diferitele molecule matriceale, controlînd astfel organizarea matricei și vîscozitatea (fluiditatea) ei. Aceeași moleculă sau forme ale ei ușor diferite se pot găsi în toate aceste localizări.

O categorie de asemenea glicoproteine sînt implicate în adezivitatea celulelor la matricea extracelulară și în organizarea structurală a matricei. Unele sînt comune tuturor țesuturilor, iar altele sînt specifice anumitor țesuturi. Dintre glicoproteinele matriceale ale adezivității le menționăm pe cele mai bine cunoscute.

3.6.2.3. Fibronectina

Fibronectina (*fibra* + *nectare* = a lega) este o glicoproteină ce se găsește pe suprafața celulară, în matricea extracelulară (inclusiv membranele bazale) și în plasma sanguină.

Fibronectina plasmatică (concentrație 0,3 g/l) este, conform dovezilor experimentale, sintetizată de hepatocite. Este posibilă și o contribuție a celulelor endoteliale.

Fibronectina poate fi însă sintetizată de o mare varietate de tipuri celulare, inclusiv fibroblaști și unele celule epiteliale, sub o formă ce se găsește la suprafața celulelor (aparține suprafeței celulare), numită fibronectină celulară.

Fibronectinele sînt compuse din subunități polipeptidice similare, cu G.M. de 220 000—250 000 daltoni, legate prin legături disulfidice în dimeri sau polimeri (fig. 3.3). Forma celulară și cea plasmatică a fibronectinei sînt foarte asemănătoare ca structură și funcție, dar nu identice. Fibronectina plasmatică este un dimer, iar cea celulară conține dimeri și multimeri. Oligozaharidele legate de azot diferă prin absența fucozei din fibronectina plasmatică și prezența mai multor radicali de acid sialic în fibronectina celulară. Există cel puțin trei regiuni în lanțul polipeptidic, ce diferă de la o formă la alta, regiuni situate în interiorul moleculei, ceea ce respinge posibilitatea ca forma plasmatică să derive din cea celulară prin clivare proteolitică. Există o a treia formă de fibronectină, produsă de celulele amniotice, ce diferă prin porțiunea oligozaharidică.

Fibronectina este sintetizată în reticulul endoplasmatic rugos ca monomer ce conține oligozaharide bogate în manoză. În aparatul Golgi fibronectina devine dimer cu legături disulfidice, iar oligozaharidele sale sînt prelu-

Scanned with OKEN Scanner

crate pînă la forma complexă care este secretată. Fibronectina secretată la suprafața celulei formează progresiv polimeri cu legături disulfidice.

Fibronectina se leagă pe de o parte de suprafața celulei și pe de altă parte, de colagen, ca și de o serie de alte molecule extracelulare, pentru a media adezivitatea celulelor, legarea lor indirectă de colagenul de toate tipurile. Fibronectina interacționează cu celulele printr-un domeniu spe-

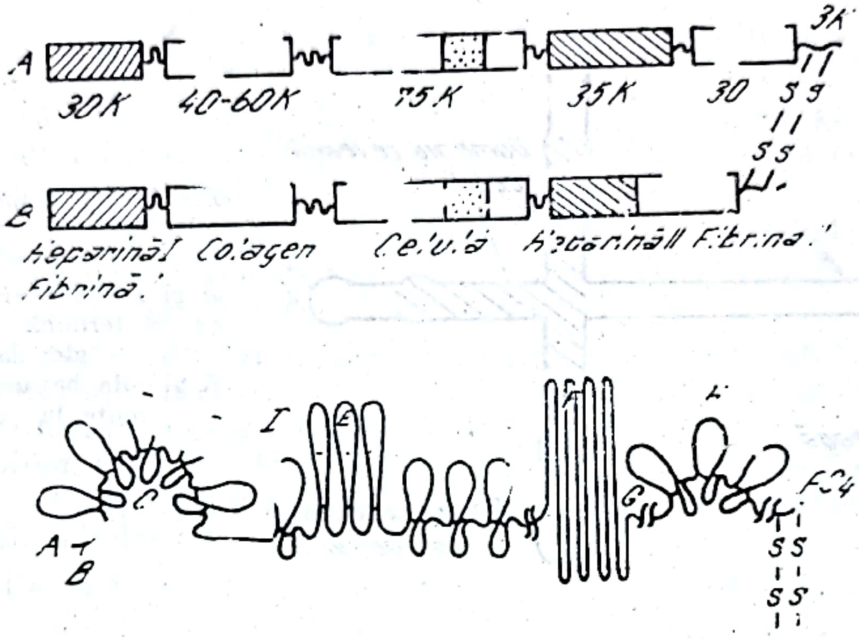


Fig. 3.3. — Domeniile funcționale și caracterele structurale de bază ale fibronectinei:

1 — dimerul fibronectinei plasmatice. Liniile ondulate indică regiuni susceptibile de clivare prin proteaze, între domeniile rezistente la proteaze; *K* — kilodaltoni; *2* — reprezentarea schematică a structurii primare și secundare a moleculei de fibronectină. Secvențele repetitive de aminoacizi sînt indicate prin bucle. *A* — capăt aminoterminal; *B* — *situs* de legare transversală prin transglutaminază; *C* — domeniu aminoterminal cu 5 „degete"; *D* și *E* — domeniu ce leagă colagenul; *F* — domeniu ce leagă celula; *G* — domeniu ce leagă heparina; *H* — domeniu ce leagă fibrina; *I* — domeniu carboxil-terminal cu punți disulfidice.

cific, mediind atașarea și etalarea lor. Ea conține o serie de alte domenii funcționale, rezistente la proteaze, aranjate modular, ce se leagă de fibrină, colagen tipurile I, II, III, IV, V, heparină, acid hialuronic, actină și cîteva alte macromolecule (vezi fig. 3.3). Mai multe asemenea situsuri au fost purificate și caracterizate ca specificitate și structură primară. Prin intermediul acestor domenii specifice, fibronectina mediază și modulează adezivitatea celulelor la matrice. Fibronectina are numeroase efecte asupra morfologiei celulei și a funcțiilor intracelulare. Favorizează de asemenea anumite activități fagocitice, stimulează mișcarea celulelor prin mecanisme deocamdată incomplet elucidate, dar care ar putea fi importante pentru evenimentele migrării celulare în dezvoltarea embrionară și în vindecarea rănilor.

Scanned with OKEN Scanner

3.6.2.4. Laminina

Laminina *(lamina* = strat) este o glicoproteină a membranelor bazale. Prin metode imunologice, la microscopul electronic laminina a fost localizată în *lamina rara* a membranelor bazale, în imediata apropiere a celulelor, ceea ce sugerează intervenția ei în interacțiunea celulelor epiteliale

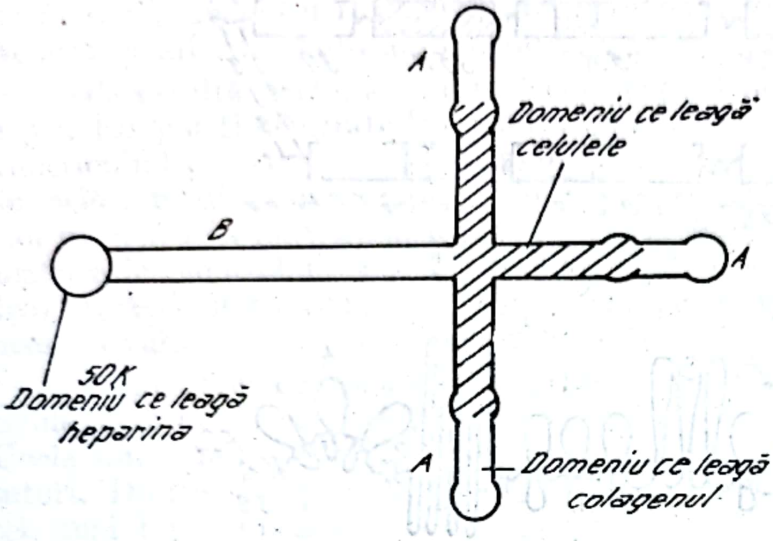


Fig. 3.4. — Domeniile structurale și funcționale ale lamininei:
A și *B* — lanțuri alfa și beta ce se termină prin domenii globulare.
Regiunile haşurate sînt rezistente la proteaze.

cu membrana bazală. Laminina este compusă din trei lanțuri A (alfa), fiecare de 200 000 daltoni și un lanț B (beta) de 400 000 daltoni, legate covalent la un capăt de punți disulfidice, formînd o moleculă cu greutatea moleculară de 1 milion daltoni (fig. 3.4). Lanțurile A și B sînt polipeptide distincte, conform criteriului imunologic, al sensibilității la proteaze și al secvenței aminoacizilor. Laminina conține 12—15% hidrați de carbon, în cea mai mare parte oligozaharide legate de asparagină.

Laminina mediază atașarea celulelor epiteliale de colagenul tip IV al membranelor bazale. Specificitatea ei nu este absolută, ea putînd să medieze și atașarea fibroblaștilor la un substrat de sticlă. Pe de altă parte, unele celule epiteliale pot folosi și fibronectina pentru a se atașa, în timp ce celulele epidermului au o strictă dependență de laminină pentru a se atașa de colagenul tip IV.

În afară de colagenul tip IV, laminina se leagă de heparină și heparan sulfat. Această interacțiune poate fi importantă în interacțiunile lamininei cu heparan sulfat-proteoglicanii ce se găsesc în cantități mari în membranele bazale.

Molecula de laminină posedă locuri specifice de legare (vezi fig. 3.4). Cartografierea acestora este încă aproximativă, nefiind clar dacă pentru același tip de moleculă există unul sau mai multe locuri de legare.

3.6.2.5. Condronectina

Condronectina *(condros* = cartilaj; *nectere* = a lega). Este o glicoproteină serică ce mediază specific atașarea condrocitelor de colagenul tip II din cartilaj *(in vitro)*. Este un multimer cu punți disulfidice, de 180 000

Scanned with OKEN Scanner

daltoni, format din subunități de aproximativ 70 000 daltoni. Condronectina este specifică pentru condrocite și demonstrează o atașare minimă pentru fibroblaști și celulele epiteliale. Ea este sintetizată de condrocite. Legarea ei de colagenul tip II necesită prezența proteoglicanilor specifici cartilajului. Dintre glicozaminoglicanii liberi, interacționează numai cu condroitinsulfatul.

3.6.2.6. Factorii serici de etalare a celulelor

În afară de condronectină și fibronectină, în ser se mai găsesc cel puțin cîteva glicoproteine cu o importanță majoră în adezivitatea celulelor la colagen și în etalarea celulelor pe acest substrat *in vitro*.

Un *factor de etalare a fibroblaștilor* și a celulelor epiteliale cu greutatea moleculară 62 000—70 000 daltoni există ca monomer și acțiunea lui necesită ca celulele atașate să sintetizeze proteine.

Un *alt factor seric de etalare*, tot monomeric, cu greutatea moleculară 70 000 daltoni, este necesar pentru etalarea unei varietăți de tipuri celulare crescute în medii de cultură fără ser.

Epibolina, o glicoproteină serică de 65 000 daltoni, favorizează etalarea celulelor epiteliale, iar alți factori serici, de 140 000 daltoni, favorizează adezivitatea fibrocitelor.

Identitatea precisă a acestora și a altor factori serici implicați în adezivitate face obiectul unor intense investigații.

3.6.2.7. Uvomorulina

Uvomorulina este o glicoproteină cu greutatea moleculară 120 000 daltoni, implicată în adezivitatea celulelor embrionului în faza de morulă. În fazele următoare ale dezvoltării embrionare și la adult poate fi identificată exclusiv în țesuturile epiteliale, independent de foița embrionară din care provine. De exemplu, la adult, ea se găsește în spațiul intercelular al epiteliului intestinal, în jurul domeniului latero-bazal al celulelor.

Uvomorulina este de asemenea implicată în agregarea dependentă de calciu a celulelor carcinomului nediferențiat, fiind distribuită uniform la suprafața celulelor maligne.

Epinectina, cu greutatea moleculară 70 000 daltoni, a fost izolată inițial din matricea extracelulară a unui tip de carcinom. Ea se găsește exclusiv în matricea epitelială.

3.6.2.8. Lectinele extracelulare

Lectinele sînt glicoproteine identificate inițial în extracte de plante ca avînd proprietatea de a aglutina hematiile. Ele au două proprietăți caracteristice:

— se leagă specific de un anumit radical glucidic;

— sînt bivalente sau polivalente, legînd concomitent mai multe molecule de același tip.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste proprietăți au impus folosirea lor în laborator pentru purificarea glicoconjugatelor, caracterizarea grupelor sanguine, studiul dinamicii receptorilor membranei celulare.

În ultimii zece ani interesul pentru lectine a crescut considerabil, deoarece ele au fost izolate și din celulele animale. Lectinele de origine animală pot fi clasificate în lectine membranare (integrate în membrane) și lectine solubile. Lectinele integrate în membrane necesită detergenți pentru a fi extrase, iar lectinele solubile nu.

— *Lectinele integrate în membrane* funcționează ca receptori ce leagă glicoconjugatele de membrana celulară sau dirijează translocarea lor intracelulară. Aceasta are drept consecință faptul că glicoconjugatele sînt ori localizate pe anumite sectoare ale membranei celulare, ori pot fi endocitate și transportate dintr-un compartiment celular în altul.

— *Lectinele solubile* sînt excluse din componența membranelor. Ele se mișcă liber în compartimentul apos intra- și extracelular, interacționînd atît cu glicoconjugatele solubile cît și cu cele legate de membrane. Studiul acestora a fost mai dificil, deoarece pot fi mai greu localizate cu precizie. Cercetările de imunocitochimie dovedesc că celulele animale, inclusiv cele umane, secretă frecvent lectine solubile și că aceste glicoproteine pot rămîne în apropierea celulelor de origine. Astfel, lectinele solubile sînt o clasă de proteine extracelulare. Deoarece matricea extracelulară e bogată în glicoconjugate iar în unele cazuri s-a dovedit că ele au capacitatea de a se lega de lectinele endogene *in vitro*, este foarte probabil că acest proces se petrece și *in vivo* în țesuturi. Ca și celelalte proteine extracelulare, cum ar fi colagenul și fibronectina, unele lectine participă la organizarea matricei extracelulare. Deoarece atît lectinele cît și glicoconjugatele sînt multivalente, ele formează mari complexe macromoleculare, sub formă de geluri vîscoelastice, care stau la baza organizării mediului extracelular.

Lectinele solubile încep prin a fi celulare. Imunocitochimic s-a stabilit că acest tip de proteine sînt mai întîi concentrate în celule și apoi exportate la suprafața celulelor. S-a sugerat că funcția comună a lectinelor solubile este aceea de a lega glicoproteinele complementare pe și în jurul celulelor care le secretă. Cele mai multe lectine solubile izolate din țesuturile vertebratelor leagă beta-galactozidele. Cel mai bine studiate sînt un grup de proteine dimerice care se găsesc la unele vertebrate și la om. Un alt grup de lectine care leagă beta-galactozidele, sînt monomeri. Din acest grup fac parte lactozo-lectina II intestinală și o lectină izolată din măduva osoasă hematogenă, denumită aglutinina eritroidă. Alte lectine solubile sînt multimeri, putînd avea pînă la 12 subunități *per* moleculă.

Unele lectine, identificate atît la păsări cît și la mamifere, reacționează cu heparina și cu glicozaminoglicanii înrudiți. Lectine beta-galactozidice se găsesc într-o mare concentrație în imediata apropiere a fibrelor elastice din plămîni, în jurul alveolelor și capilarelor plămînului, ca și în peretele vaselor sanguine, ceea ce sugerează un posibil rol al acestor lectine în elasticitatea tisulară.

Fibronectina și laminina, glicoproteine extracelulare cu importanță majoră, au și ele capacitatea de a lega heparina și de a aglutina eritrocitele. Aceasta i-a determinat pe unii autori să le includă în grupul lectinelor.

Scanned with OKEN Scanner

3.6.2.9. Proteoglicanii

Proteoglicanii sînt constituenţii majori ai matricei extracelulare, reprezentînd baza organizării ei structurale. Proteoglicanii din imediata apropiere a celulelor pot fi ataşaţi suprafeţei celulare (adsorbiţi la suprafaţa membranei celulare).

În timp ce colagenul conferă matricei extracelulare în primul rînd rezistenţă mecanică, proteoglicanii îi conferă plasticitate şi supleţe. Împreună cu acidul hialuronic, proteoglicanii controlează gradul de hidratare şi „organizează" starea apei din matrice. Ei sînt implicaţi în interacţiunile celulelor cu diferitele elemente ale matricei. Structura proteoglicanilor este un exemplu tipic de adecvare la aceste funcţii. Ei sînt macromolecule complexe (fig. 3.5), formate dintr-un „miez" proteic (un lanţ polipeptidic central), de care se leagă covalent lanţuri laterale de glicozaminoglicani, formînd un monomer proteoglicanic. Mai mulţi monomeri proteoglicanici sînt legaţi prin intermediul miezului lor proteic de o lungă moleculă de acid hialuronic. Glicozaminoglicanii (numiţi şi mucopolizaharide acide) sînt polizaharide ce conţin unităţi dizaharidice înalt repetitive (tabelul 3.I).

TABELUL 3.I

Glicozaminoglicanii şi unitatea repetitivă dizaharidică

Glicozaminoglicani	Unitate repetitivă dizaharidică
Acid hialuronic	Acid D glucuronic + N-acetil D glucozamină
Condroitin	Acid D glucuronic + N-acetil D galactozamină
Condroitin-4-sulfat (condroitin A sulfat)	Acid D glucuronic + N-acetil D galactozamină — 4-sulfat
Condroitin-6-sulfat (condroitin C sulfat)	Acid D glucuronic + N-acetil D galactozamină-6-sulfat
Dermatan sulfat (condroitin B sulfat)	Acid L iduronic + N-acetil D galactozamină-6-sulfat
Keratan sulfat	D galactozo-6-sulfat + N-acetil glucozamino-6-sulfat
Heparina	Acid glucuronic 2 sulfat (acid iduronic) + glucozamino- 6-sulfat
Heparan sulfat	Acid glucuronic + N-sulfat D glucozamină

Proteina centrală (miezul) este printre cele mai mari proteine din organism, cu o greutate moleculară de 250 000—350 000 daltoni. Ea se ancorează de acidul hialuronic prin unul din capete, de formă globulară, cu o greutate moleculară de 60 000—90 000 daltoni. Legătura se face de-a lungul a 5 unităţi dizaharidice ale acidului hialuronic şi nu este covalentă, ci probabil stereospecifică, fiind stabilizată de o proteină de legătură cu greutatea moleculară de 40 000—60 000 daltoni.

Fiecare miez proteic are ataşate numeroase lanţuri oligozaharidice şi de glicozaminoglicani. Lanţurile oligozaharidice reprezintă probabil locuri de iniţiere a sintezei sau ataşării lanţurilor lungi de glicozaminoglicani.

Scanned with OKEN Scanner

Există trei regiuni ale monomerului proteoglicanic, în funcție de tipul lanțurilor polizaharidice. Prima regiune conține domeniul globular ce se leagă de acidul hialuronic. Aceasta are puține lanțuri oligozaharidice, legate de azotul din asparagină (vezi fig. 3.5). O a doua regiune este bogată în lanțuri polizaharidice de keratan sulfat, împreună cu lanțuri de oligozaharide, legate de un atom de oxigen din serină sau treonină. Ultima regiune este bogată în lanțuri de condroitin sulfat, legate de serină, printr-un segment oligozaharidic de legătură.

Un lanț de acid hialuronic poate avea aproximativ 100 de proteine „miez" atașate. La rîndul ei, fiecare proteină „miez" are atașate aproximativ 50 de lanțuri de keratan sulfat și aproximativ 100 de lanțuri de condroitin sulfat. Greutatea moleculară totală a unui monomer proteoglicanic este de 1,5—2,5 milioane daltoni, iar greutatea totală a proteoglicanilor agregați pe o moleculă de acid hialuronic se ridică la 10^8 daltoni.

Acest model de structură a fost conceput în urma studiului proteoglicanilor din cartilaj, cei mai bine cunoscuți din punct de vedere chimic. Ceilalți proteoglicani, prezenți ubicuitar în matricea extracelulară, au aceeași structură generală, cu variații în ceea ce privește natura și numărul lanțurilor polizaharidice.

Glicozaminoglicanii conțin în molecula lor numeroase grupări acide, de exemplu COO^- din acidul glucuronic sau SO_4^{2-}, încărcate negativ, la fel ca și radicalii terminali de acid sialic ai majorității oligozaharidelor componente, încît ei sînt polianioni de dimensiuni mari. De aceea sînt capabili să se combine electrovalent cu cationii, cum ar fi de exemplu sodiul. De asemenea, interacționează cu moleculele de apă, mici dipoli electrici, în care sarcinile pozitive sînt dispuse spre periferia moleculei. Apa este astfel organizată în straturi succesive în jurul moleculei de proteoglicani intens încărcată negativ, straturile cele mai depărtate fiind cel mai slab legate. Moleculele de glicozaminoglicani sînt extrem de hidrofile, așa încît pot fixa un volum de apă de 2—3 ori mai mare decît propriul lor volum. Apa din substanța fundamentală se găsește, aproape în întregime, sub formă adsorbită la glicozaminoglicani și numai o mică parte este liberă în interstițiile matricei. Se pare că apa legată permite difuziunea substanțelor solubile prin matrice, fără mișcarea fluidului.

Dintre proteoglicanii necartilaginoși, *heparan-sulfat-proteoglicanii* au fost identificați în asociație cu suprafețele celulare, în matricea extracelulară (în special în membranele bazale) și intracelular. Ei participă la interacțiunile celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară, fiind implicați în adezivitatea și migrarea celulelor.

Greutatea moleculară a heparan-sulfat-proteoglicanilor variază între 70 000 și 4 000 000 daltoni, iar greutatea moleculară a fiecărui lanț polizaharidic lateral — între 14 000 și 70 000 daltoni, în funcție de proveniența lor.

Ca și în cazul glicoproteinelor, există forme înrudite de proteoglicani, cu localizări diferite, în matricea extracelulară, pe sau în membrana celulară, ori intracelular. Structura moleculelor sugerează în unele cazuri conversia unei forme în alta, în cadrul biosintezei acestor molecule, sau o funcționalitate multiplă. În alte cazuri legătura funcțională între ele rămîne să fie elucidată.

O categorie de heparan-sulfat-proteoglicani cu greutate moleculară relativ mică (aproximativ 75 000 daltoni) au fost izolați din membranele

Scanned with OKEN Scanner

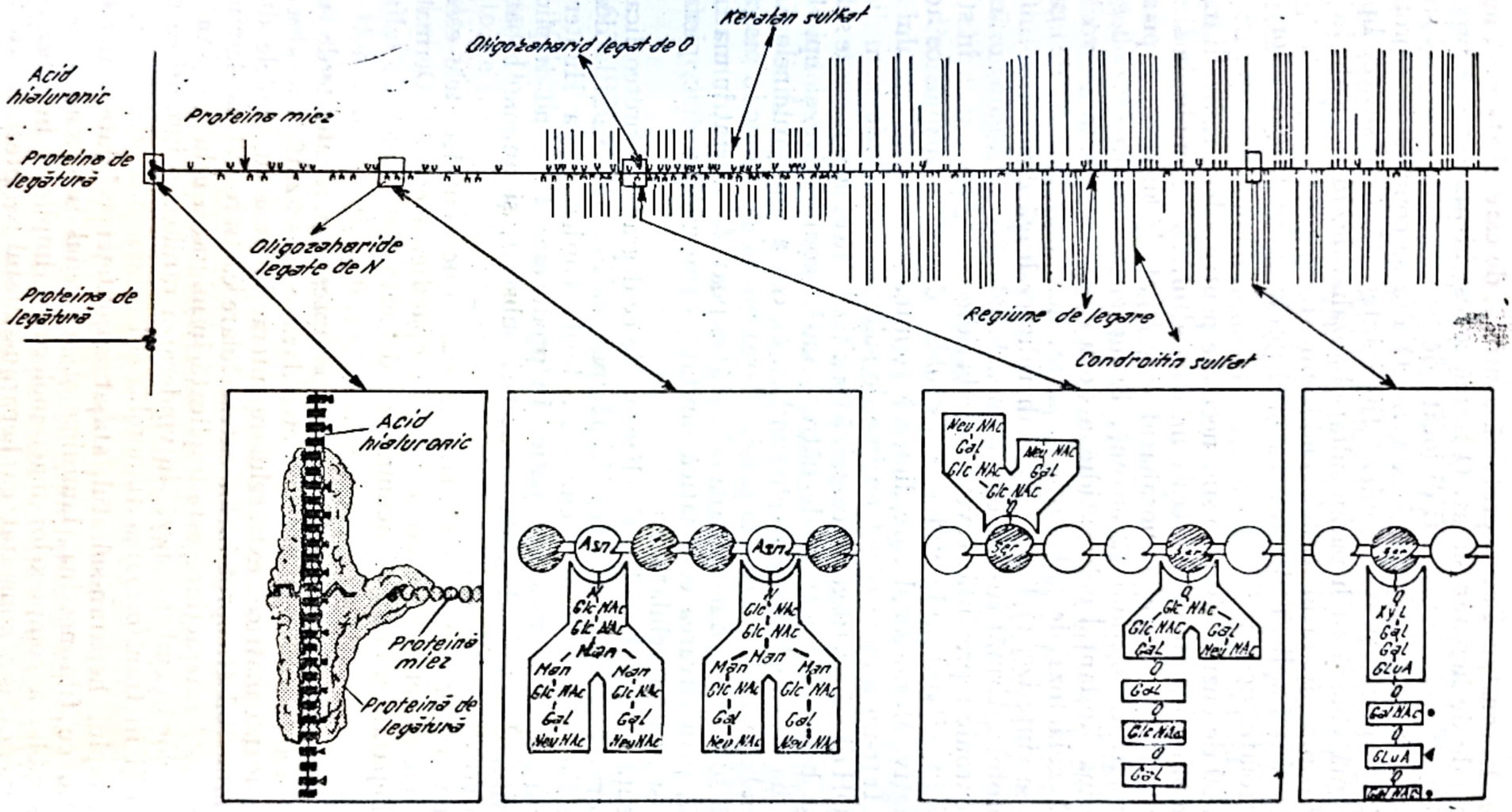


Fig. 3.5. — Schema structurii proteoglicanilor:

Asp — asparagină; *Gal* — galactoză; *Gal NAc* — N-acetilgalactozamina; *GluNAc* — N-acetilglucozamina; *GluA* — acid glucuronic; *Man* — manoză; *N* — atom de azot; *NeuNAc* — acid sialic; *O* — atom de oxigen; *Ser* — serină; *Xyl* — xiloză; ▲ — gruparea carboxil; ● — gruparea sulfat.

Scanned with OKEN Scanner

hepatocitelor. Ei constau dintr-o proteină centrală, de care se atașează numai 4 lanțuri laterale de heparan-sulfat. O formă a fost identificată ca proteină membranară periferică, ce poate fi dislocată de pe versantul extern al suprafeței celulare cu ajutorul heparinei exogene. O alta se comportă ca proteină membranară integrală, proteina „miez" fiind integrată în bistratul lipidic. O a treia formă constă în heparan-sulfat-oligozaharide, identificate în reticulul endoplasmic, aparatul Golgi, endozomi și lizozomi.

Celulele sînt implicate în sinteza și degradarea proteoglicanilor, prin procese controlate genetic.

20 sau 30 de enzime diferite sînt necesare pentru a lega radicalii monozaharidici de miezul proteic și succesiv unul de altul. De exemplu, în sinteza condroitin-sulfatului fiecare monozaharid este legat de următorul printr-o reacție controlată de o anumită enzimă. Prima enzimă controlează legarea xilozei de serina din lanțul polipeptidic, a doua cuplează galactoza cu xiloza, a treia leagă galactoza de galactoză, a patra, acidul glucuronic de galactoză. Astfel se sintetizează lanțul oligozaharidic ce leagă condroitin-sulfatul de miezul proteic. Următoarele două monozaharide, N-acetil-galactozamina și acidul glucuronic reprezintă secvența dizaharidică ce se va repeta în structura condroitin-sulfatului. Lanțul este asamblat de două enzime ce acționează alternativ. Mecanismul care dictează terminarea sintezei lanțului este necunoscut. Într-un anume punct enzime de sulfatare substituie una dintre grupările —OH din N-acetil-galactozamină (poziția 4 sau 6) cu o grupare sulfat.

Sinteza heparan-sulfatului de către celulele conjunctive și epiteliale urmează cu mare probabilitate o cale similară cu cea a glicoproteinelor integrale ale membranelor, care constă din inserarea miezului proteic în bistratul lipidic. După sosirea lui în membrana celulară, el poate fi eliberat în matricea extracelulară, prin clivarea enzimatică limitată a miezului proteic, pierzînd legătura cu suprafața celulară.

Deficiența în enzime hidrolitice lizozomale ce degradează proteoglicanii, datorată unor defecte genetice, duce la acumularea lor excesivă și la dezordini structurale. Sînt mai bine cunoscute boala Hurler, boala Hunter și sindromul Sanfilippo, distincte genetic, în producerea lor fiind implicate enzime diferite, dar care degradează același substrat, și anume heparan-sulfatul și dermatan-sulfatul.

În boala Hurler (gargoilism) manifestările clinice sînt defectele osoase, aspectul grotesc al feței, retardarea mintală, opacifierea corneei. Dermatan-sulfatul și heparan-sulfatul se acumulează datorită deficienței de alfa-L-iduronidază.

În boala Hunter și sindromul Sanfilippo lipsesc tipuri diferite de sulfataze. În toate cele trei boli beta-galactozidaza este scăzută sau absentă.

Proteoglicanii matricei extracelulare interacționează cu celulele direct sau prin intermediul glicoproteinelor extracelulare ca fibronectina, laminina, colagenul. Această interacțiune este implicată în migrarea celulară și în diferențierea celulelor în embriogeneză, în vindecarea rănilor, în înmulțirea celulară normală și în transformarea tumorală.

De exemplu, heparan-sulfatul atașat suprafeței celulare interacționează specific cu fibronectina, laminina și colagenul intercelular, contribuind la asamblarea complexelor macromoleculare implicate în adezivitate.

De asemenea, s-a constatat că heparan-sulfatul se prezintă calitativ diferit în celulele transformate tumoral. S-a stabilit mai ales că gradul de

Scanned with OKEN Scanner

sulfatare este evident redus după transformarea malignă, provocată de invazia unui virus, și că această reducere a sulfatării survine predominant la gruparea O-sulfat a lanțurilor heparan-sulfatului. Este de notat că studiile *in vivo* efectuate asupra hepatomului uman, au permis identificarea unei clase de heparan-sulfat cu un grad scăzut de sulfatare, în comparație cu ficatul uman normal, și că această diferență este specifică. Aceste studii sugerează că schimbările în molecula de heparan-sulfat pot fi puse în legătură cu alterarea interacțiunii și a creșterii celulelor epiteliale transformate malign.

Cercetări recente asupra biosintezei, secreției și distribuției topografice a proteoglicanilor din carcinomul uman de colon au demonstrat că celulele epiteliale carcinomatoase sintetizează exclusiv proteoglicani care conțin heparan-sulfat, cu o localizare și un metabolism specifice. O parte din heparan-sulfatul sintetizat de celulă este localizat primar la suprafața celulelor, apoi eliberat parțial prin proteoliză, apoi reintrodus parțial în citoplasmă și degradat. O altă parte rămîne în celulă, unde este degradat lent, nefiind niciodată eliberat în spațiul extracelular.

Proteoglicanii celulelor epiteliale normale ale colonului diferă de cei ai celulelor carcinomatoase prin mărimea hidrodinamică și densitatea de flotare mai ridicată, ca și prin lanțurile marginale de glicozaminoglicani mai scurte. Totuși, compoziția în aminoacizi a miezului proteic este similară, ceea ce dovedește că sînt molecule interrelate genetic. Comparația cu alți heparan-sulfați arată că cei din carcinomul de colon sînt mult mai mari decît cei de la suprafața hepatocitelor normale, dar apropiați ca mărime de cei sintetizați de celulele endoteliale vasculare normale și de cei elaborați de alte celule epiteliale tumorale.

3.6.3. REGLAREA CANTITĂȚII MOLECULELOR EXTRACELULARE

Moleculele extracelulare pot să regleze cantitatea altor molecule extracelulare. De exemplu, fibronectina poate stimula sinteza colagenului de către hepatocite și sinteza de colagen I mai mult decît de colagen II de către condrocite. Stimularea sintezei este secundară fie schimbărilor în forma celulei, fie efectelor metabolice directe pe care fibronectina le are — de exemplu asupra fosforilării proteinelor.

Hormonii și alți factori pot influența nivelul fibronectinei. Glucocorticoizii cresc cantitatea de fibronectină la suprafața hepatocitelor și fibroblaștilor. Factorul de creștere epidermică are aceleași efecte în anumite condiții de cultură. AMP-ul ciclic în concentrație mare, vitamina A stimulează acumularea fibronectinei la suprafața celulelor, în diferite linii celulare.

Scăderi sau uneori creșteri ale cantității, respectiv schimbarea tipului de fibronectină, laminină, colagen și heparan-sulfat-proteoglicani sînt complexe și au multe consecințe. Ele se pot corela cu pierderea funcției specializate a celulei și pot varia în raport de tipul celular.

Alterarea fibronectinei în celulele transformate malign a fost studiată în amănunt. Ea rezultă din multiple cauze, dintre care cea mai frecventă este incapacitatea (de cauză necunoscută) celulelor de a lega fibronectina și scăderea biosintezei ei, datorită nivelului scăzut de ARNm ce specifică fibronectina.

Scanned with OKEN Scanner

În afară de transformarea malignă spontană, tratarea celulelor cu substanțe tumorigene sau achiziția imortalității de către unele linii celulare *in vitro*, se soldează cu scăderea cantității de fibronectină de la suprafața celulei.

3.7. ADEZIVITATEA ȘI MORFOGENEZA

3.7.1. PRINCIPALELE EVENIMENTE ALE MORFOGENEZEI

Imediat după fecundație o succesiune de diviziuni celulare au ca rezultat formarea morulei și apoi a blastocistului. Evenimentul fundamental al morfogenezei este formarea din celulele blastocistului a celor trei foițe embrionare: ectodermul, mezodermul, endodermul. În acest proces, numit *gastrulație*, au loc mișcări celulare coordonate și modificări ale țesuturilor, într-o succesiune precisă.

Ectodermul, stratul exterior al embrionului, se dezvoltă ulterior formînd sistemul nervos și epidermul. Endodermul dă naștere plămînilor și intestinului. Mezodermul dă naștere tuturor tipurilor de țesuturi conjunctive, mușchilor netezi și striați, aparatului circulator și rinichilor.

Procesul cu semnificație-cheie pentru toate evenimentele ulterioare este *inducția embrionară*, proces în care celule ce se diferențiază, pentru a forma structuri într-o anume foiță embrionară, necesită prezența celulelor cu o istorie diferită (din aceeași foiță sau din alta). Apoziția celulelor se realizează de obicei prin mișcări generatoare de formă (morfogenetice). Împreună cu creșterea și diferențierea, schimbările în poziția relativă a celulelor constituie unul din mecanismele principale ce dau forma organelor și a organismului. Așadar, studii ale mișcării celulare, migrării celulelor și ale factorilor ce le generează și le controlează, au mare importanță în biologia dezvoltării. Atît moștenirea genetică a celulei cît și poziția celulei joacă un rol în diversificarea fenotipică, iar capacitatea de a exprima informația genetică moștenită de către blastomere se restrînge, în urma diviziunilor succesive, la un mănunchi limitat de căi. Interacțiunile celulă-celulă ce urmează aleg dintre aceste programe de diferențiere. Problema constă în a înțelege cum informația genetică și selecția declanșată de factori de mediu (epigenetici) interacționează în cursul ontogenezei.

Inducția sau diferențierea dependentă de mediu începe cu gastrulația. În embrion, aceasta este rezultatul unor secvențe continue de interacțiuni reciproce între diferite grupuri de celule și se instalează fie prin contact celular direct, fie prin contactul celulelor cu micromediul înconjurător (implicînd și un transfer de factori moleculari?).

Printre cele mai timpurii și mai importante dintre toate aceste inducții este aceea care face ca celulele ectodermale să devină precursorii țesutului nervos din sistemul nervos central. Această *inducție primară* sau *neurală* depinde de interacțiunile mezodermului și ectodermului și se soldează cu formarea plăcii neurale din ectoderm. Mai tîrziu, placa neurală suferă o serie de plieri coordonate, pentru a forma tubul neural, proces numit *neurulație*. Diferite părți ale mezodermului subiacent au efecte diferite în a determina formarea creierului anterior, mezencefalului, creierului posterior și măduvei

Scanned with OKEN Scanner

spinării. Inducția este specializată regional, deoarece este rezultatul unei secvențe în timp și spațiu de semnale inhibitoare sau stimulatoare, în embrionul în transformare.

Timpuriu în embriogeneză se produc unele evenimente morfogenetice, care reflectă variate procese primare: în timpul gastrulației insinuarea celulelor endodermale spre interiorul blastocistului prin șanțul numit linie primitivă; segregarea celulelor mezodermului pentru a forma somite, segmente din care se vor dezvolta scheletul și mușchii; gruparea unor celule ectodermice ce se alungesc pentru a da structuri numite placode, care în final generează derivate ca ganglionii nervoși sau cristalinul. Organe endodermale complexe, ca ficatul și pancreasul, se formează din endodermul intestinului primitiv. Organe mezodermale, ca rinichiul cu structurile sale tubulare complexe, se formează după o serie de inducții reciproce. Un proces deosebit de important pentru apozițiile adecvate ale țesuturilor este conversia unor straturi de celule atașate între ele (epitelii) în mase mișcătoare de celule depărtate între ele (mezenchim). Procesul invers se produce de asemenea în unele regiuni embrionare.

Această serie de evenimente au loc într-o desfășurare temporală bine definită și cu stadii organizate, structurile din fiecare stadiu servind ca bază structurilor din următorul stadiu.

Procesele ce stau la baza dezvoltării — diviziunea celulară, migrarea, adezivitatea, diferențierea și moartea celulară — sînt rezultatul a miliarde de evenimente moleculare, reglate nu numai genetic dar și, concomitent, de evenimente epigenetice (adică nespecificate direct de anumite gene).

Adezivitatea celulelor este numai un aspect al evenimentelor complexe ale dezvoltării, ce poate fi studiat la nivel molecular, demonstrîndu-se că ea este mediată de molecule de proteine aparținînd membranei celulare și matricei extracelulare.

3.7.2. MOLECULELE ADEZIVITĂȚII CELULĂ-CELULĂ

Moleculele adezivității celulă-celulă (CAM) au fost identificate și izolate prin metode imunologice. Prin imunofluorescență au fost identificate o categorie de asemenea molecule, prezente pe neuronii din sistemul nervos central, care au fost numite N-CAM *. Anticorpii contra N-CAM interferă cu dezvoltarea normală a țesutului nervos, dezorganizîndu-i structura.

Tehnici similare au dus la identificarea a două alte molecule ale adezivității celulare: L-CAM izolate inițial din celulele hepatice ale embrionului și Ng-CAM izolate din neuroni.

Prin cromatografie de afinitate aceste molecule au fost purificate și apoi analizate. Ele sînt glicoproteine. N-CAM conțin cantități neobișnuit de mari de acid sialic, într-o formă polimerizată, puțin comună.

Lanțul polipeptidic al N-CAM, cu o greutate moleculară de 160 000 daltoni, constă din trei domenii, legate prin porțiuni extrem de susceptibile la clivarea enzimatică (fig. 3.6). Domeniul amino-terminal se proiectează în afara celulei și încorporează o regiune ce constitue situsul de legare cu regi-

* N-CAM = *Neural-Cell Adhesion Molecules*, identificate de G. M. Edelman.

unea corespunzătoare a N-CAM de pe altă celulă. Un domeniu central conține majoritatea radicalilor de acid sialic. Domeniul carboxil-terminal este asociat cu membrana celulară, iar o parte din el, cu bistratul lipidic al membranei, ca proteină transmembranară.

S-a demonstrat că mecanismul legării este homofil (adică are loc între molecule similare de pe suprafețele celulelor ce interacționează).

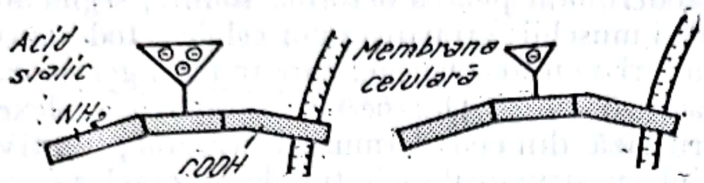


Fig. 3.6. — Molecula adezivității celulelor nervoase (*N-CAM*), schematizată în forma embrionară *(E)* și forma adultă *(A)*. Lanțul proteic are trei domenii. Domeniul amino-terminal conține locusul de legare. Domeniul mijlociu are grupări de acid polisialic încărcate negativ. Domeniul carboxil terminal este inserat în bistratul lipidic al membranei celulare. Forma *E* are de trei ori mai mult acid sialic decît forma *A*.

Acidul sialic din moleculă nu are un rol direct în legarea moleculelor. După îndepărtarea lui enzimatică, prin sialidază, N-CAM continuă să se lege specific de neuroni. Totuși, acidul sialic influențează indirect comportamentul moleculelor. S-a observat că N-CAM din creierul embrionar conține de trei ori mai mult acid sialic decît N-CAM din creierul adult. Probabil, într-un anumit moment al dezvoltării, forma embrionară (E) a moleculei este convertită în forma adultă (A) sau înlocuită cu aceasta. Forma adultă are o capacitate de legare mai mare decît forma embrionară.

L-CAM * are o greutate moleculară de 124 000 daltoni și nu conține acid polisialic. Spre deosebire de N-CAM, L-CAM mediază adezivitatea celulelor numai în prezența ionilor de calciu. Nu s-a stabilit cu precizie dacă legarea L-CAM este homofilă sau heterofilă (între molecule diferite ale suprafețelor celulare). L-CAM au fost inițial izolate din ficat, dar ele se găsesc pe mai multe tipuri celulare, jucînd un rol fundamental, împreună cu N-CAM, în dezvoltarea embrionului.

Ng-CAM ** apar mai tîrziu în cursul dezvoltării și mediază adezivitatea între neuroni și nevroglii. Ele se găsesc numai pe neuroni și nu pe nevrogliile de care ei aderă. Probabil că pe nevroglii există o moleculă a adezivității de care se leagă Ng-CAM ce rămîne să fie identificată. Cu alte cuvinte, mecanismul legării este heterofil.

N-CAM, L-CAM și Ng-CAM nu au specificitate încrucișată, adică nu se leagă între ele pentru a media adezivitatea dintre celule.

3.7.3. INTERACȚIUNILE CELULĂ-CELULĂ ÎN MORFOGENEZĂ

Există două alternative în concepția asupra adezivității celulă-celulă. Prima presupune prezența unor *marker*-i moleculari (proteine) pe suprafața celulelor, fiecare din ele complementară (prin afinitate chimică) cu altă moleculă *marker* situată pe celula ce vine în raport cu ea. Există numeroase teorii asupra chimioafinității. Principala obiecție ce li se aduce este că, avînd în vedere complexitatea organismelor, varietatea raporturilor ce se stabilesc

* L-CAM = *Liver*-CAM.
** NG-CA M = *Neuron-glia*-CAM.

Scanned with OKEN Scanner

între celule, numărul de *marker*-i specifici de suprafață, determinînd localizarea celulelor, ar trebui să fie imens, ca și numărul genelor ce ar specifica proteinele respective. Specificarea greșită a unui singur *marker* ar produce haos structural. Fiind predeterminat, un asemenea model este static. Odată ce *marker*-ii corespunzători se „recunosc", nu ar mai fi necesar dinamismul care totuși caracterizează procesele morfogenetice.

Alternativa este un mod mai dinamic de a concepe aceste evenimente. Procesele de diviziune celulară și migrare celulară capătă o anumită orientare prin apariția unor structuri temporare, care le orientează cursul, existînd probabil anumite momente critice în care ele sînt constrînse să ia o anumită cale, care, la rîndul ei, orientată cursul evenimentelor ulterioare sau, altfel spus, modulează funcția celulelor. Alăturarea celulelor în structuri ar fi astfel specificată de un număr mai mic de molecule ale adezivității, funcția lor fiind modulată de evenimentele morfogenetice. În acest din urmă caz interacțiunile dintre molecule nu necesită o absolută specificitate (complementaritate) ci doar o anumită selectivitate ce apare în cursul proceselor dinamice.

Conform modelului dinamic propus pentru interacțiunea celulelor, trebuie să existe mecanisme ce modulează capacitatea de legare a moleculelor celulare ale adezivității. Aceasta se produce cu o mare probabilitate prin modularea cantității, distribuției și componenței chimice a moleculelor adezivității, ce sînt proteine membranare. Schimbările menționate modifică comportamentul celulelor angajate în mișcări morfogenetice. În fazele timpurii ale embriogenezei au loc schimbări în distribuția și prevalența unor molecule, iar în perioada perinatală are loc conversia formei E a N-CAM în forma A, constînd în reducerea masivă a cantității de acid sialic din moleculă. Prezența acidului sialic în domeniul central fie că schimbă forma domeniului ce se leagă de omologul său, fie respinge direct molecula corespunzătoare de pe celula vecină. Experimental, s-a confirmat cu claritate că moleculele cu mai puțin acid sialic au o mai mare capacitate de legare.

Creșterea de două ori a numărului de molecule N-CAM pe o anumită membrană duce la creșterea de 30 de ori a capacității de legare.

Conversia formei E în A și schimbările în distribuția și numărul moleculelor la suprafața celulelor duc la schimbări importante în capacitatea de agregare în cursul dezvoltării, o condiție necesară pentru formarea de structuri, cu puncte de constrîngere de natură cinetică. Schimbările ambilor parametri sînt continue, încît definesc un mare număr de stări ale CAM.

Cum se corelează schimbările CAM cu evoluția structurilor embrionului în dezvoltare?

Studiile prin imunofluorescență efectuate pe embrionul de găină au arătat că N-CAM și L-CAM pot fi detectate foarte devreme, înainte de formarea foițelor embrionare, avînd o distribuție relativ uniformă. Mai tîrziu, cînd se dezvoltă linia primitivă, celulele stratului mijlociu care migrează, nu evidențiază CAM. Celulele care vor da naștere plăcii neurale încetează să mai aibă L-CAM, în schimb dau o reacție intens pozitivă pentru N-CAM. Ectodermul neural și non-neural se delimitează unul de altul, celulele non-neurale devin pozitive pentru L-CAM, ca și celulele endodermale.

Embriologii au conceput hărți care arată ce vor deveni celulele din fiecare regiune embrionară, indicînd țesuturile și structurile cărora le vor da naștere la un moment dat. O asemenea hartă a regiunilor blastodermului (echivalentul blastocistului la embrionul de găină), inducînd structurile pe

Scanned with OKEN Scanner

care le vor genera, a fost corelată cu o hartă a expresiei CAM în regiunile respective (fig. 3.7). Rezultatul este o imagine bidimensională reprezentînd suprafaţa blastodermului, unde detaliile exacte de structură au fost sacrificate pentru a accentua conexiunile şi vecinătăţile între regiuni, deosebit de importante pentru inducţia embrionară. Regiunile centrale ce exprimă

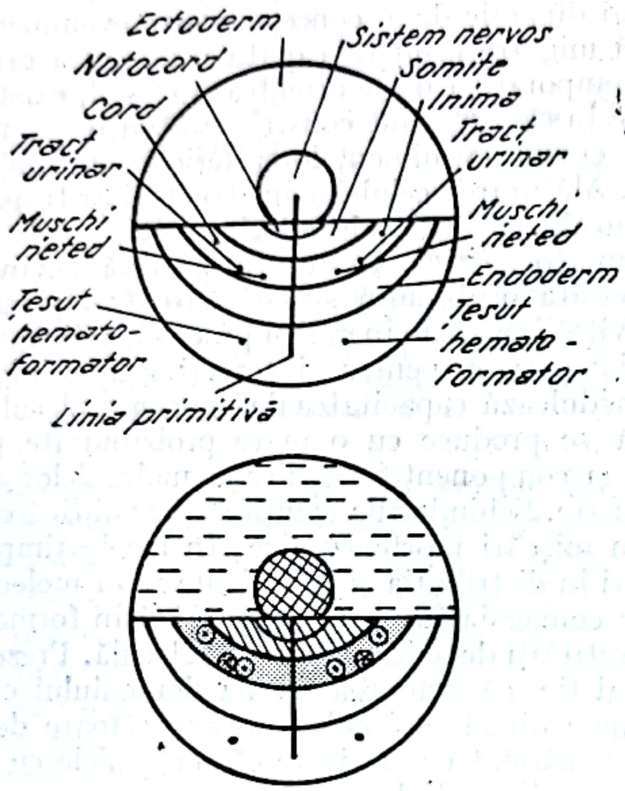


Fig. 3.7. — Harta destinaţiei regiunilor blastocistului corelată cu expresia moleculelor adezivităţii. Discul reprezintă suprafaţa blastocistului şi regiunile ce vor da naştere ţesuturilor şi organelor. Regiunile haşurate — N-CAM; în gri — L-CAM; regiunile albe — nu exprimă CAM.

N-CAM, destinate să dea naştere plăcii neurale, notocordului şi somitelor, sînt înconjurate de regiuni care exprimă L-CAM, care cuprind ectodermul non-neural şi endodermul. Există un gradient abrupt al N-CAM în sens craniocaudal. Reacţia pentru N-CAM este intensă în placa neurală, mai puţin intensă şi variabilă în timp, în notocord şi somite.

O succesiune interesantă este observată în elementele rinichiului care îşi are originea în mezoderm: L-CAM şi N-CAM apar şi dispar într-o succesiune corelată cu stadiile inducţiei embrionare reciproce dintre mezenchimul mezonefrosului şi ductul wolffian. Întîi L-CAM apar pe duct, apoi N-CAM apar pe tubii mezonefrosului, în timp ce se formează epiteliul acestora, după care sînt înlocuite cu L-CAM cînd tubulii se dezvoltă.

Deci, CAM suferă schimbări dinamice în ordinea apariţiei, în distribuţie şi cantitate, în funcţie de inducţiile primare sau secundare în embrion.

Atunci cînd epiteliile se convertesc în mezenchim, CAM dispar de pe suprafaţa celulelor.

Deşi cercetările asupra CAM sînt încă la început, ele arată că există o topologie a expresiei lor, dar că nici una dintre aceste molecule nu aparţine exclusiv unei foiţe embrionare. Aceasta confirmă că există mai mulţi determinanţi ai formei embrionului şi sugerează că succesiunea şi expresia CAM reprezintă momente de restricţie în procesele care duc la stabilirea formei structurilor.

Scanned with OKEN Scanner

Conform metodelor de imunofluorescență, 2/3 din suprafața blastodermului sînt pozitive pentru cele două tipuri de molecule. Probabil că în fazele inițiale ale dezvoltării numărul tipurilor de CAM nu este foarte mare, deși cercetările sugerează prezența unor molecule încă neidentificate. O problemă ce urmează să fie rezolvată în viitor, este dacă alte CAM sau forme înrudite cu cele cunoscute sînt necesare pentru interacțiunile, extrem de sofisticate, între țesuturi ce apar în stadiile ulterioare ale dezvoltării.

3.7.4. INTERACȚIUNILE CELULĂ-MATRICE EXTRACELULARĂ ȘI MIGRAREA CELULARĂ

În timpul organogenezei placa neurală își schimbă pregnant forma pentru a da în final tubul neural, proces care nu implică totuși migrarea individuală a celulelor. S-a demonstrat că fenomenul de neurulație implică schimbări în forma celulelor și în pozițiile lor relative, mai mult decît migrația celulelor individuale sau proliferarea semnificativă a celulelor.

Totuși, în timpul organogenezei, are loc migrația adevărată a celulelor, individual sau în grup, ce joacă un rol major în anumite procese histogenetice.

Migrarea celulară interesează pe clinician ca și pe embriolog. Pentru oncologi acest fenomen este asociat cu metastazele și expansiunea țesuturilor maligne în ariile învecinate. Pentru embriologi, invazia celulară nemalignă este asociată cu evenimentele morfogenetice normale. În viața postnatală există o serie de celule de origine mezenchimală care își păstrează capacitatea de migrare, cum ar fi leucocitele sau fibroblaștii. La nivelul celulelor individuale, însăși fecundația poate fi considerată un proces de invazie, în care ovocitul este „invadat" de spermatozoid. În dezvoltarea embrionară, exemple ale acestui proces sînt: implantarea blastocistului la mamifere în endometrul matern; procesul de formare al intestinului definitiv, în care țesutul endodermal derivat din ectoderm se inseră în stratul endodermal existent, pe care-l deplasează; migrarea celulelor germinale primordiale, care apar în embrion la distanță de gonade și ajung la epiteliul germinal prin migrare interstițială sau prin circulație; dezvoltarea organelor hematopoietice; edificarea sistemului nervos, mai ales acea parte a lui ce derivă din crestele neurale.

3.7.4.1. Migrarea interstițială

Migrația celulelor în embrion este urmărită cu ajutorul unor *marker*-i artificiali (de exemplu peroxidaza de ridichi; dextran fluoresceinat), care se injectează direct în blastomerele embrionului și marchează liniile celulare, deoarece sînt transmise numai la celulele-fiice. Migrația poate fi urmărită și prin *marker*-i naturali, de exemplu: activitatea enzimatică specifică a unor celule, prezența unor determinanți antigenici specifici.

Creasta neurală apare în timpul închiderii tubului neural din marginile plicilor neurale pe cale de fuzionare. Cînd părăsesc primordiul neural, celulele crestei neurale își pierd întîi aranjamentul epitelial, precedat de ruptura membranei bazale și dispariția moleculelor responsabile de adezivitatea celulă-celulă. Molecula adezivității celulelor nervoase (N-CAM) este prezentă în membrana celulelor epiteliului neural și dispare de pe suprafața celulelor

Scanned with OKEN Scanner

crestei neurale de îndată ce ele se individualizează și sînt gata de migrație (fig. 3.8).

Mecanismele care reglează disociația celulelor plicilor neurale și motivul pentru care ele acționează numai pe celulele viitoarei creste neurale, sînt încă ipotetice. Probabil că intervin activități proteolitice foarte limitate, iar un bun candidat pentru a participa la acest proces este activatorul plasminogenului, o protează ce conține serină neutră. Activatorul plasminogenului se găsește în țesuturile embrionare, iar plasminogenul, substratul său natural, se găsește în embrion, în tot cursul dezvoltării.

Odată individualizate, celulele crestei neurale, gata de migrare, au nevoie de un substrat propice și de un spațiu în care să se miște. La microscopul electronic de *scanning* s-a observat că celulele crestei neurale emit filopode care operează în translocarea celulelor, avînd posibilitatea de a adera la unele elemente ale substratului. Cînd celulele crestei neurale părăsesc epiteliul

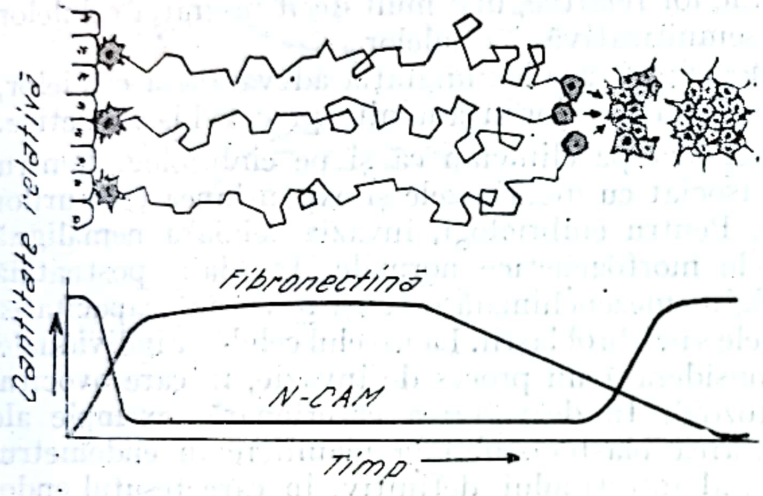


Fig. 3.8. — Migrarea celulelor din crestele neurale este însoțită de schimbări în expresia N-CAM, ce sînt prezente inițial pe suprafața celulelor, dispar în timpul migrării și reapar la destinație, cînd ele interacționează cu alte celule. Concomitent are loc creșterea și respectiv scăderea fibronectinei ce servește ca substrat al migrării.

neural, ele pătrund în spații fără celule, limitate lateral de membrane bazale și conținînd matrice extracelulară.

Dintre componentele matricei extracelulare cel mai abundent în momentul migrării este acidul hialuronic, o moleculă mare care, datorită proprietăților sale hidrofile, lărgește spațiul și oferă un substrat adecvat migrării. Descreșterea concentrației acidului hialuronic într-un stadiu ulterior este legată de oprirea și agregarea celulelor migratoare. Din punctul de vedere al celulelor, capacitatea lor de invazie (migrare) trebuie să fie însoțită de capacitatea lor de a penetra matricea extracelulară. Un *marker* al capacității de migrare a celulelor este nivelul activității enzimelor produse de celule, cu efect de clivare a moleculelor extracelulare. Dintre acestea, menționăm *hialuronidazele*, un grup de cel puțin patru enzime, care au în comun activitatea de clivare a legăturilor glicozidice ale acidului hialuronic și fiecare în parte, acțiune hidrolitică specifică asupra altor glicozaminoglicani. Activitatea hialuronidazică este mare în țesuturile invazive, în dezvoltarea embrionară (invazie nemalignă) și în cancer. La pacienții cu tumori maligne există niveluri crescute ale activității hialuronidazice. În țesuturile normale este bine știut că placenta și trofoblastul blastocistului în implantație, ca și capul spermatozoidului, conțin hialuronidază în cantitate mare. S-a arătat de asemenea că, în momentul în care somitele sînt invadate de celulele crestei neurale,

crește activitatea hialuronidazică și descrește hialuronatul, ceea ce duce la coalescența celulelor în ganglionii spinali. Îndepărtarea hialuronatului cu ajutorul enzimelor împiedică migrarea celulelor crestei neurale. Linia primitivă a embrionului seamănă cu tumorile invazive de origine epitelială, ca arie de celule ce sînt capabile să invadeze alt țesut și avînd un indice mitotic ridicat. Hidroliza locală de către mezoderm a membranei bazale adiacente ectodermului poate fi implicată în favorizarea migrării mezodermului din linia primitivă și ar putea fi baza fiziologică a interacțiunilor inductive între epiteliu și mezenchim. Țesuturile mezenchimale în general, și mai ales în sistemele pe cale de dezvoltare, se caracterizează prin capacitatea lor de a degrada matricea extracelulară, indicată de niveluri ridicate ale activității hialuronidazei.

S-au făcut studii asupra implicării probabile a acidului hialuronic și a hialuronidazelor în specificarea informației poziționale în sistemele pe cale de dezvoltare. Există un gradient al concentrației hialuronatului în mugurele membrului superior la embrionul de găină. Acest gradient are punctul maxim la extremitatea distală a mugurelui și descrește proximal. Un asemenea gradient poate fi generat dacă extremitatea distală a membrului produce hialuronat pe măsură ce crește, în timp ce o hialuronidază prezentă în toate regiunile mugurelui este răspunzătoare de îndepărtarea lui. Este probabil ca acest gradient să fie implicat în specificarea informației de poziție proximo-distală.

Formarea organelor epitaliale prin ramificare implică sinteza locală și îndepărtarea matricei cu glicozaminoglicani adiacente epiteliului. Acest model a fost propus inițial ca explicație pentru morfogeneza glandelor salivare, dar poate fi adecvat altor evenimente morfogenetice ce implică pliere, curbare sau ramificare, cum ar fi închiderea tubului neural sau geneza cristalinului. În cazul morfogenezei epiteliului glandei salivare, a fost descrisă o funcție de degradare a glicozaminoglicanilor din matrice de către mezenchimul ce înconjură epiteliul viitoarei glande. Aceeași situație se poate aplica în cazul morfogenezei plămînului, a glandei mamare și a altor organe înconjurate de matrice mezenchimală, care suferă plieri sau ramificări.

Prin proprietățile lor hidrofile și datorită cîmpului electrostatic intens negativ generat de matricele polianionice cu acid hialuronic, ele intervin în controlul permeabilității țesuturilor și reglarea mediului ionic al embrionului.

Matricea extracelulară a căilor de migrare conține un abundent material fibrilar, compus mai ales din fibronectină, împreună cu cantități mici de colagen tipurile I și III. Prezența lamininei și a colagenului tip IV este restrînsă la membrana bazală ce limitează căile de migrare. Domeniile moleculare ale fibronectinei se leagă specific de un receptor al suprafeței celulare, de colagen și, respectiv, de glicozaminoglicani. Toate țesuturile ce mărginesc calea de migrare secretă fibronectină, în timp ce celulele crestei neurale — nu. Ca și acidul hialuronic, fibronectina *scade cantitativ* cînd celulele s-au agregat pentru a forma ganglioni. În același timp, celulele încep să sintetizeze din nou N-CAM (vezi fig. 3.8). În procesul migrării, moleculele de fibronectină par să joace rolul unor locuri de ancorare pentru filopodele emise de celulele crestei neurale, rol susținut de dovezile experimentale: celulele crestei neurale se atașează și se etalează pe fibronectina plasmatică dezvoltînd numeroase filopode, în timp ce pe colagen și laminină ele aderă foarte slab. Matricele secretate de fibroblaști simulează substratul pe care migrează celulele crestei

Scanned with OKEN Scanner

neurale *in vivo*. Asemenea matrice favorizează viteza cea mai mare de migrare, 50 μm/oră, estimată ca viteză de migrare *in vivo*. Anticorpii antifibronectină inhibă migrarea celulelor crestei neurale, care se reia imediat ce se adaugă fibronectină plasmatică.

O problemă dificilă este aceea a mecanismelor care asigură orientarea mișcării celulelor în migrare. Celulele crestei neurale migrează întotdeauna îndepărtîndu-se de primordiul neural. Au fost propuse mai multe ipoteze: *chimiotaxia*, presupunînd că celulele răspund la o substanță din țesutul de destinație pentru care au chimioafinitate, ceea ce le face să se miște de-a lungul unui gradient crescînd al concentrației substanței respective; *haptotaxia*, mecanism bazat pe afinitatea crescîndă a suprafeței celulare pentru substrat pe direcția migrării; *ghidarea de contact*, ipoteză conform căreia celulele urmează căi preexistente.

Se pare că mecanismele ce controlează migrarea celulelor crestei neurale sînt de natură nespecifică, deoarece căile lor de migrare favorizează și migrarea altor celule invazive, cum sînt celulele sarcomatoase. Fibroblaștii sau celulele somitelor transplantate pe aceste căi nu migrează, ci rămîn pe loc, urmîndu-și programul de diferențiere.

Ce anume face ca celulele crestei neurale să se oprească și să se aglomereze în puncte specifice ale embrionului? Au fost demonstrate *in vitro* și cu siguranță intervin *in vivo*, schimbări ale adezivității celulelor migratoare pentru substratul migrării, ca și între ele. E greu să se răspundă la întrebarea dacă aceste schimbări rezultă în urma unui stimul exterior sau sînt modulate conform unui program prestabilit. Schimbările ontogenice în compoziția matricei extracelulare, ca și interpunerea unor bariere fizice, ce rezultă din procese morfogenetice variate, declanșează oprirea celulelor crestei. Aceasta nu exclude implicarea în acest mecanism a schimbării proprietăților suprafeței celulelor, reglate ca desfășurare temporală, conform unui program intrinsec.

3.7.4.2. Migrarea prin sîngele circulant

Altă cale urmată de celulele migratoare pentru a ajunge la destinație este penetrarea vaselor sanguine. Celulele sînt apoi purtate de curentul sanguin, pe care îl părăsesc la locul oportun. Sînt cunoscute două exemple importante de celule care migrează prin sînge: celulele germinale primordiale (gonocite); celulele hematopoietice care iau naștere în locuri diferite de organele hematopoietice pe care le colonizează și unde mai tîrziu se vor diferenția. Nici unul dintre primordiile organelor hematopoietice nu conține celule cu potențe hematopoietice, ceea ce presupune că ele trebuie însămînțate cu celule progenitoare pentru a-și căpăta funcția hematoformatoare. În ambele exemple au fost propuse ipoteze chimiotaxice.

Intrarea limfocitelor în nodulii limfatici și plăcile Peyer are loc prin recunoașterea specifică a unor locuri de legare, situate pe suprafața endoteliului venulelor. Molecula de pe suprafața limfocitului, care mediază această recunoaștere, a fost identificată prin tehnici imunologice.

Scanned with OKEN Scanner

3.8. COMUNICAREA INTERCELULARĂ

3.8.1. GENERALITĂȚI

Comunicarea dintre celule constituie un factor hotărîtor în evoluția organismelor multicelulare, întrucît reglează dezvoltarea și interrelația normală în și dintre țesuturi.

Aceste comunicări pot fi efectuate prin *semnale chimice* (hormoni, neurotransmițători), reprezentate de diferite molecule secretate de unele celule, sau prin *joncțiunile gap*.

Cele două sisteme de semnale chimice ale organismelor superioare ce funcționează în procesul de comunicare intercelulară, respectiv sistemul nervos și sistemul hormonal, diferă între ele prin direcția în care acționează. Primul trimite mesaje directe neuronale la celule-țintă specifice, cum ar fi celulele musculare, glandulare sau alți neuroni, prin eliberare de molecule numite neurotransmițători. Comunicarea intercelulară se efectuează la nivelul sinapselor.

Acțiunea sistemul hormonal este de obicei mai puțin directă. Deși sînt cunoscute mecanismele autocrine și paracrine prin care hormonul acționează asupra celulei care îi dă naștere și, respectiv asupra unei celule adiacente, forma cea mai comună de comunicare hormonală este aceea în care glandele cu secreție internă eliberează hormonii ce vor acționa asupra celulelor sau organelor aflate la distanță în organism. Hormonii sistemului endocrin ajung prin sînge la celulele-țintă, care conțin receptori ce recunosc și reține numai molecula hormonală care acționează asupra lor.

La aceste diferențe între cele două sisteme, se mai adaugă și faptul că neuronii acționează la distanțe mici asupra unei celule sau a unui set celular, comunicarea intercelulară realizîndu-se în cîteva milisecunde. În sistemul endocrin, hormonul eliberat de o anumită glandă este dus la distanță de locul de origine și poate afecta celule sau organe în diferite regiuni ale corpului. În acest caz, comunicarea intercelulară se realizează în cîteva ore.

Considerate la nivel molecular, cele două sisteme nu sînt așa de diferite, întrucît ambele determină mesagerul specific să intre în contact cu receptorii celulelor-țintă. Unii neurotransmițători par să servească, așa cum se întîmplă și pentru hormoni, numai în sisteme specializate de comunicare intercelulară și să dezvolte funcții specifice.

Mai mult, recent s-a arătat că multe molecule – mesager pot fi folosite în comun de ambele sisteme — nervos și endocrin. Un exemplu în acest sens îl constituie norepinefrina, hormon secretat de medulosuprarenală, dar care acționează și ca neurotransmițător în sistemul nervos simpatic. Același tip de mesager poate însă să ducă mesaje diferite în sistemul hormonal față de sistemul nervos.

Pentru a răspunde la semnalele primite, celulele conțin pe suprafața lor, în citoplasmă sau în nucleu, proteine specifice care primesc și reține mesajul, numite *proteine receptor*.

Scanned with OKEN Scanner

3.8.2. RECEPTORII

Pentru a răspunde la semnalele primite, celulele conţin pe suprafaţa lor, în citoplasmă sau în nucleu, proteine specifice care primesc şi reţin mesajul, numite *proteine receptor* sau simplu — *receptori.*

Unele celule din organism sînt specializate în principal pentru a desfăşura activităţi caracteristice, deci foarte apte de a lega semnale chimice speciale, avînd în constituţia membranei de suprafaţă un număr mare de receptori specifici pentru aceştia. Cele mai multe semnale chimice influenţează celulele-„ţintă" fie prin atenuarea proprietăţilor sau a ratei de sinteză a proteinelor existente, fie prin iniţierea sintezei unor noi proteine. De asemenea, în unele cazuri, moleculele chimice semnal pot să se lege de receptorii identici dar să producă răspunsuri foarte diferite de diferitele celule-ţintă, deoarece fiecare tip de astfel de celulă este programată să răspundă caracteristic la fiecare semnal specific. Unele răspunsuri celulare la semnalele chimice sînt rapide şi tranzitorii (de exemplu la insulină), altele sînt lente şi de lungă durată (de exemplu la estradiol). Majoritatea moleculelor-semnal sînt solubile în apă, intrînd mai rapid în acţiune. Puţine dintre ele — ca hormonii steroizi şi hormonul tiroidian — sînt solubile în lipide, deci au efect mai lent şi întîrziat.

Substanţele-semnal recepţionate pot activa receptorii celulari *(substanţe agoniste:* hormoni neurotransmiţători), schimbînd total sau parţial conformaţia şi funcţia proteinei de legare a lor; sau pot bloca receptorii celulari fără să le modifice componenţa *(substanţe antagoniste:* în general medicamentele). Antagoniştii previn legarea agoniştilor de receptori şi le blochează astfel acţiunile (a altor medicamente sau a altor molecule reglatorii endogene), mecanismul fiind competitiv (blocare completă) sau necompetitiv (blocare parţială).

În stare fiziologică a celulei, *numărul de receptori, capacitatea receptoare* şi *densitatea receptorilor* pe sau în interiorul ei sînt determinate, pe de o parte, de viteza de regenerare sau de viteza moleculelor proteice receptori şi, pe de altă parte, de viteza de consum a acestora.

În prezenţa unei concentraţii mari de agonişti se activează un număr crescut de receptori, dar în egală măsură apare şi o pierdere a lor însoţită în acelaşi timp de sinteze de noi molecule-receptori. Se vorbeşte în acest caz de o *reglare omologă în jos (homologous down regulation).* Dacă se previne activarea receptorilor, de exemplu prin denervare şi se elimină astfel acţiunea neurotransmiţătorului, sau se protejează receptorii prin blocanţi (antagonist competitiv), se obţine o creştere a capacităţii receptorilor de a lega moleculele-semnal, deci o *reglare omologă în sus (homologous up regulation).*

Capacitatea receptorilor de a lega moleculele chimice poate să se modifice şi sub influenţa unor substanţe bioactive al căror punct de impact să nu se situeze la nivelul receptorilor specifici lor. Este vorba de *reglarea heterologă* în jos şi în sus *(heterologous down or up regulation);* de exemplu, densitatea receptorilor pentru oxitocină creşte în miometru sub influenţa estrogenilor şi scade sub influenţa progesteronului; sau densitatea receptorilor beta-andrenergici creşte în miocard sub acţiunea tiroxinei.

Conceptul de receptor mobil. În multe cazuri activarea receptorilor determină agregarea şi formarea lor în grămezi sau complexarea receptorului cu

Scanned with OKEN Scanner

unele proteine-țintă care erau izolate în membrana celulară, deci o mișcare a receptorilor pe suprafața celulară. De asemenea și receptorii din citoplasmă sînt mobili; de exemplu, receptorii pentru steroizi, care după formarea complexului receptor-hormon, migrează în nucleul celular.

3.8.2.1. Clasificarea receptorilor

Ca și pentru enzime, s-a procedat la o subclasificare a receptorilor în funcție de: structură, funcție, răspunsul la substanțe agoniste și antagoniste competitive. Astfel, receptorii pentru catecolamine sînt de două feluri: alfa- și beta-adrenergici, după potența lor ierarhică pentru catecolamine; pentru receptorii alfa- ordinea este următoarea: epinefrină > norepinefrină >> izoproterenol, iar pentru cei beta-: izoproterenol > epinefrină > norepinefrină.

Fiecare categorie alfa poate fi subdivizată mai departe în $alfa_1$ și $alfa_2$, după afinitățile pentru o substanță blocantă a lor, respectiv prazosimul, sau fiecare categorie beta — în $beta_1$ și $beta_2$, după afinitățile pentru epinefrină și norepinefrină. Receptorul $beta_1$ are afinități aproape egale pentru epinefrină și norepinefrină, în timp ce receptorul $beta_2$ are afinități mai mari pentru epinefrină decît pentru norepinefrină.

Antagoniștii beta-adrenergici pot bloca accelerarea cardiacă produsă de norepinefrină, fără să poată preveni reglarea prin catecolamine a constricției arteriolare. La fel agoniștii alfa-adrenergici pot induce vasoconstricții fără să stimuleze beta-receptorii cardiaci.

3.8.2.2. Mecanismul de acțiune a receptorilor

Receptorii de suprafață sînt activați de moleculele-semnal hidrofile. Acestea sînt cele mai numeroase, incluzînd majoritatea hormonilor, cu excepția hormonilor steroid și tiroidian, precum și neurotransmițătorii. Moleculele hidrofile nu pot străbate membrana celulară decît după ce se leagă la suprafața acesteia de receptorii specifici.

Hormonii hidrofili, care constituie majoritatea (hipofizari, epifizari, paratiroidian, medulosuprarenali), circulă repede prin sînge și lichidele extracelulare, acționează rapid, cu efecte ce încep la cîteva secunde după legarea de receptori și se termină după cîteva minute. Complexul hormon-receptor, care reprezintă *primul mesager*, pătrunde în interiorul celulei prin endocitoză mediată de receptori (insulina, TSH-ul hipofizar etc.). Receptorii de suprafață, care leagă hormonii hidrofili, suferă modificări ale conformației atunci cînd leagă ligandul (hormonul) la exteriorul celulei. Aceste modificări generează un semnal intracelular care modifică comportamentul celulei-țintă, semnal intracelular socotit a fi cel de al *doilea mesager* și reprezentat de adenozin — 3′5′ — monofosfat ciclic (AMPc) și ionii de calciu din celulă. Complexul hormon-receptor generează semnalul intracelular activînd sau inactivînd *adenilatciclaza*, enzimă legată de plasmalemă, care fie va cataliza pe fața citoplasmatică a membranei celulare sinteza de AMPc din ATP, fie va deter-

Scanned with OKEN Scanner

mina direct fosforilarea proteinelor celulare (de exemplu factorul epidermal de creştere) (fig. 3.9).

Activarea şi inactivarea adenilatciclazei se realizează în următoarea secvenţă: *a*) legarea hormonului de receptori alterează conformaţia acestuia din urmă şi expune zona sa de legare către *proteina G intraplasmalemală*;

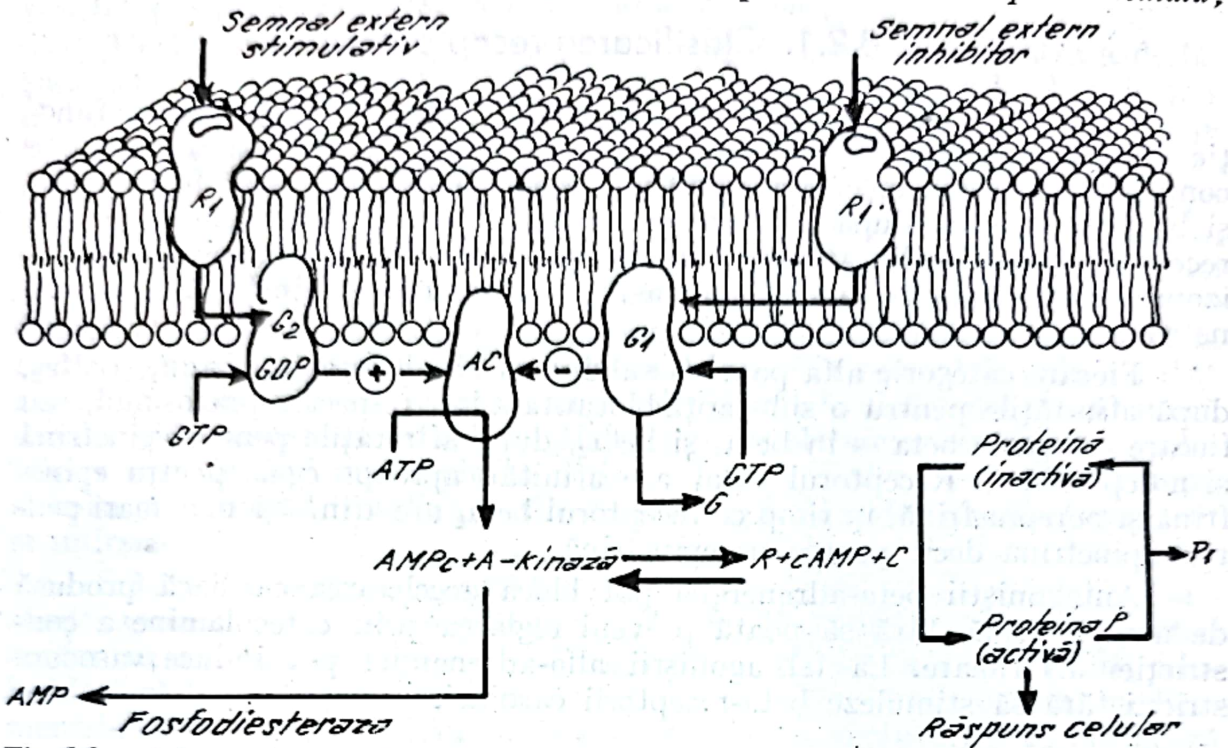


Fig. 3.9. — Schema circuitului semnalelor: în calea AMP-ului ciclic semnalele de la receptorii stimulatori şi inhibitori converg către enzima adenilatciclază *(AC)*, care converteşte ATP-ul în AMPc; proteinele *G* sînt activate de GTP, cînd acesta este hidrolizat în GDP.

b) în stratul bilipidic membranar, complexul hormon-receptor se asociază cu proteina G, aceasta din urmă devenind aptă să lege GTP în loc de GDP; legarea GTP modifică în aşa fel, conformaţia proteinei în G încît să poată activa adenilatciclaza ca să formeze AMPc din ATP; *c*) proteina G hidrolizează apoi legarea moleculei de GTP la GDP, ceea ce duce la inactivarea adenilatciclazei.

AMPc acţionează mai departe, activînd enzime specifice intracelulare, numite *proteinkinaze*, care catalizează transferul unui grup fosfat de la ATP la reziduul serină sau treonină al unui grup de proteine din celula-ţintă. Prin fosforilare se reglează activitatea acestor proteine. Acţiunea AMPc este tranzitorie, deoarece celula, prin alte enzime, cum ar fi *fosfoproteinfosfatazele* (enzime ele însele dependente de AMPc), defosforilează proteinele ce au fost fosforilate prin acţiunea proteinkinazelor dependente de AMPc.

De asemenea *GMPc* în concentraţie de 10 ori mai mică decît a AMPc poate activa şi el ca al doilea mesager. *Enzima guanilatciclaza*, care catalizează formarea GMPc din GTP, nu este întotdeauna legată de membrana celulară şi nici întotdeauna activată de complexul hormon-receptor. Una din funcţiile GMPc este de a iniţia creşterea concentraţiei de calciu intracelular.

Ionii de calciu din celulă reprezentînd şi ei cel de al doilea mesager, se găsesc în citosol în concentraţie mai mică de 10^{-7} M. După cum unii receptori de suprafaţă sînt cuplaţi funcţional cu moleculele de adenilatciclază, alţii sînt

cuplați funcțional cu canalele de calciu din plasmalemă. Deschiderea acestor canale se face prin activarea lor de către complexul hormon-receptor, avînd drept rezultat un influx sporit de calciu în citosol fie din fluidul extracelular, fie din depozitele interne de calciu. Creșterea concentrației de calciu este tranzitorie, ca și a adenilatciclazei, deoarece canalele intraplasmalemale de calciu se deschid tranzitoriu, iar calciul intrat în citosol este rapid pompat în afara celulei și/sau legat intracelular de molecule mici calcafine, de fosfați sau de macromolecule — calmoduline și/sau de membranele unor organite intracitoplasmatice ca reticulul endoplasmic și mitocondriile.

Mediul extracelular nu poate fi însă singura sursă de ioni de calciu pentru celulă. Cercetări recente au dovedit că pe lîngă ionii de calciu proveniți din mediul extracelular, aceștia pot fi preluați de celulă și din rezervoarele interne. În cazul acesta, semnalele externe au acces la calciul intracelular prin stimularea hidrolizei unor molecule lipidice din componența membranei celulare cum ar fi anumite fosfolipide membranare, în special inozitolul, ce se dovedesc a avea un rol important în viața celulei și în comunicarea dintre celule. Ele acționează ca un al doilea mesager, avînd drept scop mobilizarea calciului și creșterea concentrației sale intracelulare.

Membranele celulelor conțin trei tipuri de inozitol, dar numai unul din ele, și anume fosfatidil inozitol-4,5-bifosfatul (PIP_2), derivat din fosfatidil

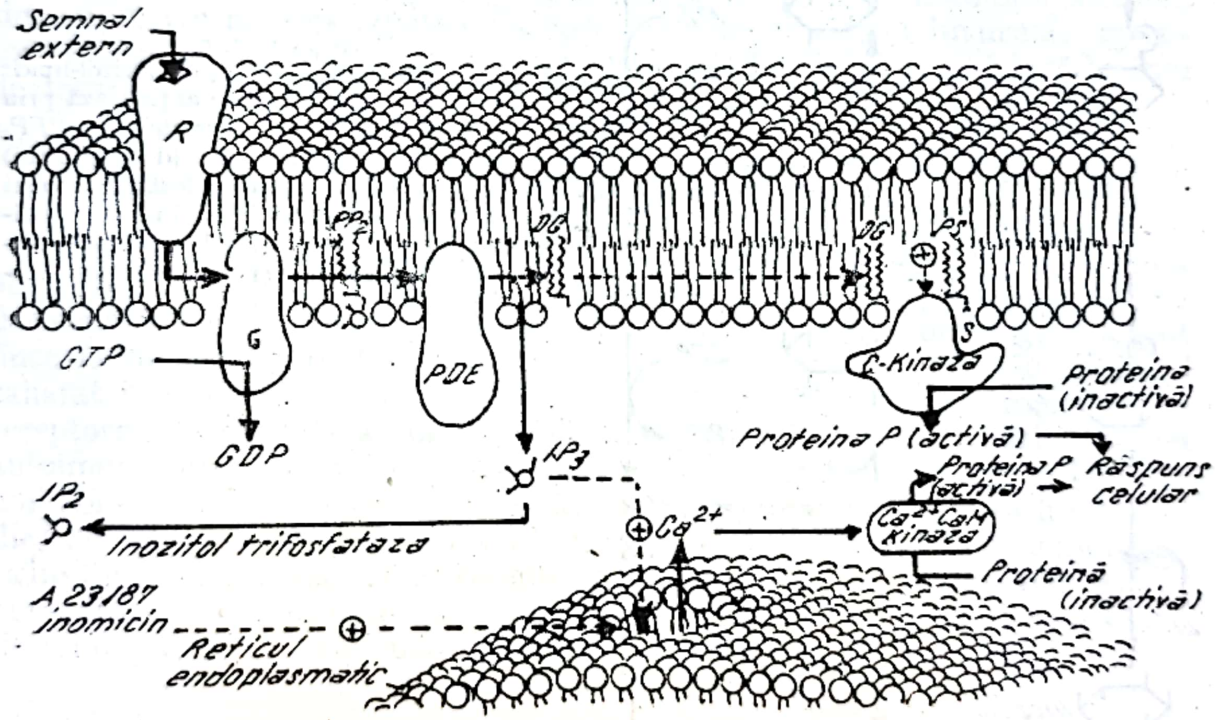


Fig. 3.10. — Schema circuitului semnalelor: în calea inozitol-lipid semnalele externe se prind de receptori (*R*), care transmit informația prin proteina G, care activează fosfodiesteraza (*PDE*). Enzima clivează PIP_2 în IP_3 și DG (inozitoltrifosfat și diacilglicerol).

inozitolul ce se află în stratul intern al bistratului lipidic, pare să se modifice prin hidroliză și să declanșeze mecanismul de mobilizare a calciului.

La semnalele externe PIP_2 este hidrolizat în *diacilglicerol* (DG) și *inozitoltrifosfat* (IP_3), prin activarea enzimei *fosfodiesteraza* (fig. 3.10).

Cei doi produși rezultați intră într-o secvență de reacții chimice care necesită prezența continuă a ATP-ului și *CTP* (citozintrifosfat), care sînt

suse de grupări fosfat. Grupul de proteine G cuplează și în acest caz receptorii de suprafață cu o enzimă, respectiv *fosfolipaza C*. În final, diacilglicerolul și inozitoltrifosfatul sînt reciclate, primul printr-o serie de reacții ce compun *ciclul lipidic*, cel de al doilea printr-un alt lanț de reacții ce realizează ciclul *inozitolfosfat*. Ambele cicluri converg în final, reconstituind fosfat inozitolul membranar (fig. 3.11).

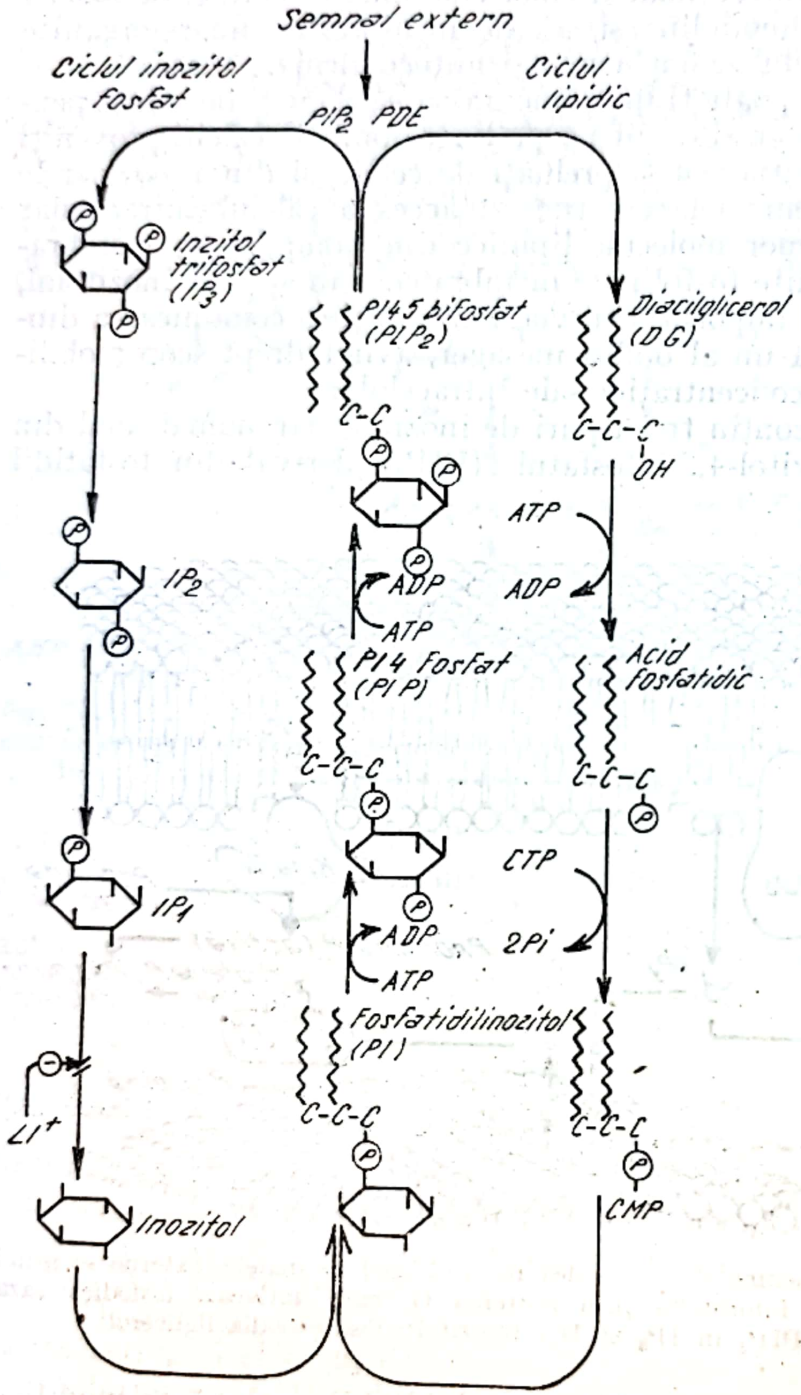


Fig. 3.11. — Ciclul inozitol-lipid: semnalele externe acționează prin fosfodiesterază care clivează PIP_2 în mesagerii *DG* (diacilglicerol) și IP_3 (inozitoltrifosfat). Acești doi compuși intră în reacții chimice care, în final, duc la recombinarea lor și formarea de fosfatidilinozitol (*PI*).

Astfel, folosind AMPc sau calciul ca al doilea mesager, semnalele hormonale extracelulare sînt mult amplificate și făcute specifice pentru fiecare tip. Expusă pe o perioadă lungă la acțiunea hormonului, celula-țintă pierde adeseori capacitatea de a răspunde la ligand. Procesul este reversibil și se numește *adaptare sau desensibilizare*. Aceasta se realizează fie prin endocitarea unor

receptori de suprafață, fie prin inactivarea receptorilor ca urmare a legării prelungite de ligand.

Hormonii hidrofobi (hormonii steroizi și hormonul tiroidian) traversează plasmalema celulei-țintă prin simplă difuziune, legîndu-se strîns dar reversibil de un receptor specific intracitoplasmatic aflat în citosol sau pe unele organite celulare. Hormonii hidrofobi circulă prin sînge legați de o proteină plasmatică. Ei pot rămîne în plasma sanguină cîteva ore (hormonii steroizi) sau zile (hormonul tiroidian). O celulă-țintă poate conține aproximativ 10 000 de receptori pentru steroizi, fiecare din aceștia legînd o moleculă de hormoni steroizi specifici cu mare afinitate. Prin această legare, proteina-receptor suferă o modificare conformațională alosterică și dobîndește astfel afinitate pentru ADN. Modificarea conformațională (activarea receptorului) duce la acumularea complexului hormon-receptor în nucleu pe cromatină, determinînd reglarea transcripției unui număr mic de gene (aproximativ 50). La o concentrație mare de hormoni se activează și se leagă moleculele de hormoni steroizi, un număr mare de receptori specifici din citosol. Cînd nivelul hormonal scade, moleculele steroide se detașează de receptori, aceștia întorcîndu-se în citoplasmă. Deoarece receptorii se leagă nespecific de ADN, este deosebit de greu de identificat zonele specifice de legare a complexului hormon-receptor steroid pe cromatină.

Hormonul tiroidian, hidrofob, se leagă și el, ca și hormonii steroizi, de receptori intracitoplasmatici, dar spre deosebire de aceștia din urmă, receptorii hormonului tiroidian sînt concentrați în nucleul celulei-țintă încă înainte de legarea hormonului.

3.8.2.3. Patologia receptorilor

În procesul de îmbătrînire, ca și în unele boli neuropsihice, s-a observat o modificare a densității receptorilor fără să se poată spune încă dacă aceasta este primară sau secundară. Perturbările de ordin genetic pot duce la modificări în formarea moleculelor mesagere (insulina în diabetul zaharat insulinorezistent) sau tulburări genetice ale cuplării hormonului cu receptorii. Afecțiunile autoimune ale receptorilor, datorită blocării funcției autoimune prin autoanticorpi (de exemplu anticorpi antireceptori și tireostimulinei — TSH), duc la o hiperactivare a receptorilor și în final la hipertiroidie; anticorpi pentru receptorii de insulină care în unele cazuri acționează ca insulinomimetici (activează receptorii), în alte cazuri ca blocanți ai acestora; autoanticorpi care stimulează receptorii dopaminei ce pot constitui cauze de schizofrenie; imunoautoanticorpi beta-adrenergici la astmatici.

3.8.2.4. Receptorii și cancerul

Se pare că există un raport între scăderea densității receptorilor și malignitate, raport ce depinde de gradul de diferențiere a celulei. Cunoașterea densității receptorilor poate avea valoare prognostică — diminuarea acestora constituind un indiciu defavorabil. Terapia tumorilor maligne, în special mamare, endometriale, de prostată sau leucemii, urmărește îndeaproape cunoașterea densității receptorilor, pentru a stabili, în funcție de aceștia, sensibilitatea tumorii la diferitele citostatice administrate.

Scanned with OKEN Scanner

3.8.3. CITOKINELE

Citokinele reprezintă produși sintetizați de diferite tipuri de celule, în special de celule activate în prezența antigenilor. Ele acționează în secvență și constituie un al doilea semnal endogen, care, împreună cu antigenii, amplifică rapid mecanismele de apărare ale macrofagelor, limfocitelor și ale altor tipuri de celule. Citokinele sînt produși asemănători limfokinelor din limfocitele T. Cele mai cunoscute citokine sînt interleukina I, interleukina II și interferonul. Rareori citokinele pot fi produse de unele glande și tot rareori apar în serul sanguin, fapt pentru care pot fi considerate ca fiind *„imunohormoni"* care acționează ca semnale intracelulare asupra celulelor-țintă. Citokinele lucrează secvențial, în sensul că interleukina I crește producția de interleukină II, care, la rîndul ei, induce secreția de interferon și împreună cresc mecanismele de apărare ale organismului.

3.8.3.1. Interleukina I

Interleukina I stimulează limfocitele T periferice în a produce mai multe limfokine, crește producerea de factori chemotactici pentru limfocite și producerea factorului stimulator al creșterii coloniilor celulare.

3.8.3.2. Interleukina II

Interleukina II este reprezentată prin limfokine mitogene, cel mai bine cunoscută fiind factorul de creștere a limfocitelor T. Interleukina II este produsă de limfocitele T mature. Pe lîngă efectul de stimulare a proliferării limfocitelor T, interleukina II determină și eliberarea crescută de interferon sau crește toxicitatea celulelor T în absența proliferării lor.

Interferonii sînt peptide cu acțiune antivirală nespecifică ce inhibă replicarea virusurilor, precum și cu activități antiproliferative și imunoregulatorii. Sînt identificate trei clase de interferoni; *a*) interferoni alfa — secretați de leucocite și limfocite stimulate; *b*) interferoni beta — secretați de fibroblaste, celule epiteliate și macrofage; *c*) interferoni gamma — secretați de limfocitele T.

3.9. BAZELE IMUNOGENEZEI

3.9.1. GENERALITĂȚI

Sistemul imun îndeplinește o varietate de funcții care concură la menținerea homeostaziei și unității organismului. Ca și sistemul endocrin, el își exercită rolul prin componente ce acționează la distanță de locul lor de origine.

Toate vertebratele au sistem imun, în timp ce la nevertebrate acesta este foarte primitiv reprezentat, în special prin celulele fagocitare. Sistemul

Scanned with OKEN Scanner

imun are rolul principal de a distruge organismele patogene invadatoare şi moleculele toxice produse de acestea, precum şi celulele proprii care au suferit o transformare malignă. Celulele sistemului imun deosebesc proteinele proprii *(self)* de proteinele străine organismului în care se află *(non self)*; împotriva acestora din urmă se concentrează răspunsurile de apărare din partea sistemului imun, cu scopul distrugerii lor şi deci al apărării organismului.

Ocazional, la unii indivizi, celulele sistemului imun pierd această abilitate de diferenţiere a *self*-ului de *non self* şi acţionează împotriva proteinelor organismului propriu. În aceste situaţii iau naştere *reacţiile autoimune* care pot genera entităţi patologice, adesea cu sfîrşit letal.

3.9.2. COMPONENTELE SISTEMULUI IMUN

Sistemul imun este alcătuit complex din componenta *celulară* (macrofage şi limfocite), componenta *genetică* şi componenta *moleculară*.

3.9.2.1. Componenta celulară

La vertebrate, în răspunsul imun sînt angajate două categorii de celule, şi anume limfocitele şi macrofagele. *Limfocitele*, componentele celulare majore ale sistemului imun, sînt de două tipuri: *limfocite sau celule B*, care reacţionează cu antigenii solubili la care răspund prin secreţia de imunoglobuline generînd *imunitatea umorală*, şi *limfocitele sau celulele T*, care reacţionează cu antigenii prezenţi pe suprafaţa altor celule şi secretă limfokine generînd *imunitatea celulară* (vezi detalii la capitolul despre sînge).

Moleculele receptoare care generează aceste răspunsuri imune sînt structuri heterodinamice: polipeptide cu lanţuri L *(light)* şi lanţuri H *(heavy)* pentru imunoglobuline, ce servesc ca receptori de antigen pentru limfocitele B, şi polipeptide cu lanţuri alfa şi beta ca receptori de antigeni pentru limfocitele T. La cele două categorii de limfocite, lanţurile L, H, alfa şi beta conţin regiuni V (variabile) ce recunosc antigenul şi regiuni C (constante) implicate în ancorarea membranei şi transmiterea semnalului.

Atît limfocitele B cît şi limfocitele T, datorită diversităţii receptorilor, sînt capabile să lege un număr extrem de mare şi diferit de antigeni, fiecare celulă în parte fiind însă specializată cu un receptor funcţional pentru un singur tip de antigen. Urmează activarea limfocitelor şi expansiunea lor clonală.

Macrofagele joacă rol important în procesul imun, fără a avea o implicaţie specifică pentru un anumit tip de antigen; rolul lor este să concentreze antigenii şi să-i prezinte limfocitului (detalii la capitolul despre sînge).

3.9.2.2. Componenta genetică şi moleculară

3.9.2.2.1. Imunogenii (antigenii)

Antigenii sînt substanţe care, introduse în organism, pot declanşa răspunsul imun umoral, celular sau mixt. Ei sînt reprezentanţi în principal de proteinele monomoleculare, iar în unele condiţii, şi de polizaharide, polipep-

Scanned with OKEN Scanner

tide sintetice sau alți polimeri sintetici ca polivinilpirolidona. Acizii nucleici nu sînt imunogeni, dar anticorpii antinucleoproteici pot apărea în serul bolnavilor cu lupus eritematos sistemic.

Imunogenitatea moleculelor depinde de mai mulți factori printre care: recunoașterea lor ca *self* sau *non self* de către limfocitele organismului-gazdă; *mărimea moleculei*, care în general trebuie să aibă o greutate moleculară mai mare de 10 000 (există și rare excepții, cînd moleculele mici, cu greutate moleculară chiar sub 1 000, pot fi imunogene). Cele mai puternice imunogene sînt macromoleculele proteice cu greutatea moleculară mai mare de 100 000; *complexitatea chimică* — se presupune că *imunogenitatea* crește o dată cu complexarea structurală. Astfel aminoacizii aromatici sînt mai imunogeni decît cei nearomatici, sau polipeptidele bogate în tirozină sînt mai potente decît cele sărace în acest aminoacid; *constituția genetică a speciei*; metodele de administrare a antigenului (mai imunogen dacă este injectat intravenos decît subcutan).

Macromoleculele imunogene prezintă numai porțiuni restrinse care se pot lega cu anticorpii. Aceste porțiuni, numite *determinanți antigenici*, variază ca număr, mărime și complexitate chimică de la un antigen la altul. Capacitatea unei regiuni din molecula antigenului care activează ca determinant antigenic să inducă formarea de anticorpi specifici, poartă denumirea de *imunopotență*. Această capacitate depinde în fiecare moment, de accesibilitatea și expunerea cît mai completă a regiunii imunopotente, de încărcătura electrică a moleculei sau de factori genetici. Determinanții antigenici, de obicei de mărimea unei tetrapeptide, sînt alcătuiți din subunități care vor contribui inegal la reactivitatea cu anticorpii. Gradul de influență asupra reactivității este o măsură a *imunodominanței* componentei determinantului antigenic.

O caracteristică a imunogenilor este capacitatea lor de a induce imunitatea celulară mediată de limfocitele T, derivate din timus, sau de a stimula formarea de anticorpi de către limfocitele B, în cazul imunității umorale. Pentru aceasta, imunogenul trebuie să posede cel puțin doi determinanți antigenici, unul pentru limfocitele T, care să declanșeze răspunsul celular, și altul pentru celulele B. De exemplu: glucagonul, hormonul pancreatic, format din 29 de aminoacizi, funcțional are determinanți care interacționează cu limfocitele T (determinanți imunogeni), alții cu anticorpii (determinanți haptenici). Limfocitele T răspund numai la fragmentul terminal carboxil, iar limfocitele B recunosc determinantul sau determinanții de la capătul terminal amino-. Unii imunogeni, ca polizaharidele bacteriene sau unele proteine polimerizate, sînt timus-independente, nu declanșează răspunsul limfocitelor T dar sînt capabile să activeze celulele B producătoare de anticorpi. Acestea din urmă secretă însă anticorpi în proporții reduse sau exclusiv din clasa IgM, cu memorie slabă sau complet absentă.

3.9.2.2.2. Antigenii de histocompatibilitate

Reprezintă o familie de antigeni constituiți din molecule glicoproteice, care sînt codificate de un complex de gene numit *complexul major de histocompatibilitate* sau, pe scurt, MCH *(major histocompatibility complex)*.

Antigenii de histocompatibilitate pot fi *majori* și *minori*. Ei sînt prezenți pe suprafața tuturor celulelor indivizilor din aceeași specie. În consecință, diferă de la un individ la altul sau de la o specie la alta. Antigenii de histo-

Scanned with OKEN Scanner

compatibilitate reprezintă principalele ţinte pentru marea majoritate a limfocitelor T, în reacţiile adverse de rejectare a transplantelor şi grefelor, chiar dacă alţi antigeni, în număr mai mare, sînt prezenţi concomitent pe suprafaţa celulelor străine din organul transplantat. Rolul acestor antigeni în raport cu ţesuturile sau organele transplantate, a determinat studii intense privind genele care determină formarea antigenilor leucocitari umani, conturîndu-se astfel *sistemul HLA (human leucocyte antigens)* care s-a extins în conţinut şi cuprinde în prezent întregul complex de histocompatibilitate.

Prin structura şi distribuţia lor în ţesuturi, antigenii HLA se împart în două clase:

— *clasa I* cuprinde antigenii clasici de histocompatibilitate, reprezentaţi prin antigenii HLA-A, HLA-B şi HLA-C;

— *clasa a II-a*, numită şi clasa antigenilor celulari B, cuprinde antigenii HLA-D, HLA-DR, MB (DC), MT, DS şi SB.

La aceste două clase, unii adaugă şi clasa a III-a cu antigenii BF, C_2 şi C_4, care sînt componente ale complementului.

Clasa I de antigeni de histocompatibilitate se găsesc practic pe suprafaţa tuturor celulelor. Moleculele antigenelor din această clasă sînt glicoproteine alcătuite din două lanţuri polipeptidice: unul din lanţuri, *glicoproteic polimorf*, cu greutate moleculară de aproximativ 44 000, este codificat de gene din complexul HLA. Aceasta este legat necovalent de al doilea lanţ, *proteic nepolimorf*, alcătuit din proteina *b_2-microglobulina* cu greutate moleculară de aproximativ 12 000, şi determinat de o genă din cromozomul 15 (fig. 3.12).

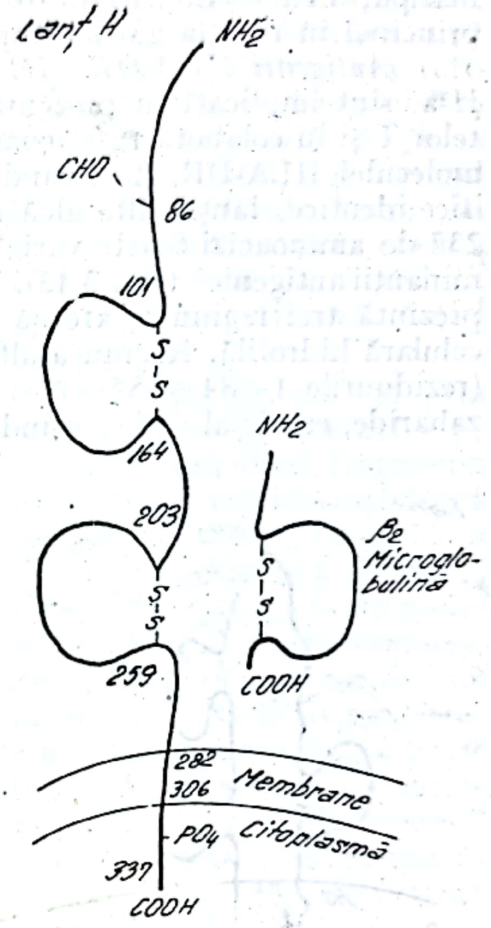


Fig. 3.12. — Reprezentarea schematică a unei molecule HLA clasa I. Molecula este formată dintr-o glicoproteină cu G.M. de 44 000 (lanţul H), legată necovalent de o proteină nepolimorfă, beta-2-microglobulina, cu G.M. de 12 000.

NH_2—grupare aminoterminală; *COOH*—grupare carboxil terminală; *CHO*—sediul carbohidratului din lanţ; *FO_4* — fosfat; *S-S-* — legătură disulfidică; numerele indică reziduurile de aminoacizi ce prezintă unele particularităţi.

Lanţul glicoproteic polimorf, alcătuit din 337 de reziduuri de AA, poate fi împărţit în *trei regiuni*, care, începînd de la capătul terminal amino-, sînt: regiunea hidrofilă extracelulară (reziduurile 1 — 281), regiunea hidrofilă transmembranară (reziduurile 282—306) şi regiunea hidrofilă intracelulară (reziduurile 307 — 337). *Regiunea hidrofilă extracelulară* este, la rîndul ei, divizată în *trei domenii* ce corespund reziduurilor 1—90 de care se ataşează oligozaharidul, reziduurile 91—180 şi reziduurile 181—271. Determinanţii antigenici sînt localizaţi fie în primul domeniu, fie în al doilea, fie în ambele. Regiunea hidrofilă intracelulară poate fi fosforilată, permiţînd astfel transmiterea semnalelor în interiorul celulei (vezi fig. 3.12).

Clasa I de antigen de histocompatibilitate este prima recunoscută de limfocitele *T killer* ale organismului-gazdă şi declanşatoare principale ale

fenomenului de rejecție de către aceștia, prin citoliza mediată celular. De asemenea ele determină citoliza celulelor infectate viral și care au pe suprafața lor antigeni minori de histocompatibilitate, dar numai în cazul în care celulele infectate poartă și aceeași clasă de antigeni de histocompatibilitate.

Clasa a II-a de antigeni se găsește predominant la suprafața celulelor imunocompetente, în special pe limfocitele B și macrofage, dar și pe limfocitele T în repaus sau în activitate.

Dintre antigenii acestei clase, *antigenii HLA-D* prezintă însă structuri mai puțin cunoscute. Ei au fost descoperiți în 1972 și se pare că ar avea rolul principal în reacția gazdei împotriva grefei *(graft-versus most reaction)*.

Antigenii HLA-DR (HLA-D-related). Ca și alți antigeni din clasa a II-a, sînt implicați în prezentarea antigenilor, de către macrofage, limfocitelor T și în colaborarea eficientă dintre celulele imunocompetente. Structura moleculei HLA-DR, de curînd elucidată, constă din două lanțuri polipeptidice identice, lanțul alfa alcătuit din 229 de aminoacizi și lanțul beta, din 237 de aminoacizi foarte variabili de la o moleculă la alta, care conține determinanții antigenici (fig. 3.13). Ca și pentru antigenii din clasa I, fiecare lanț prezintă trei regiuni: externă hidrofilă, intramembranară hidrofilă și intracelulară hidrofilă. Regiunea alfa-extracelulară hidrofilă conține două domenii (reziduurile 1—84 și 85—178), fiecare avînd locuri de atașare pentru oligozaharide, cel de al doilea avînd în plus și punți disulfidice (vezi fig. 3.13).

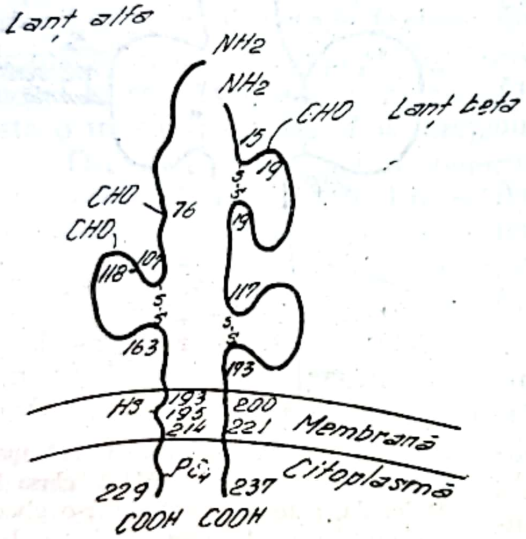


Fig. 3.13. — Reprezentarea schematică a unei molecule de HLA-DR. Molecula este formată dintr-o proteină cu G.M. de 34 000 (lanțul alfa) în legătură necovalentă cu o glicoproteină ce are G.M. de 29 000 (lanțul beta).

Regiunea extracelulară hidrofilă a lanțului beta conține de asemenea două domenii (reziduurile 1—91 și 92—192): primul pentru legarea oligozaharidului, iar amîndouă conțin punți disulfidice.

Antigenii SB (secundary B-cell) sînt diferiți de ceilalți antigeni din clasa a II-a. Ei pot da un răspuns proliferativ secundar puternic și pot acționa ca antigeni-țintă pentru limfocitele T citotoxice.

Antigenul major de histocompatibilitate (H_2) a fost prima dată identificat și demonstrat la șoarece în complexul major de histocompatibilitate, fiind codificat în cel puțin 3 loci genetic separați, numiți H-2K, H-2D, H-21.

Antigenii de histocompatibilitate de suprafață sînt detectați de obicei serologic, prin *microtoxicitatea mediată de complement*. Excepție fac HLA-D care este detectată prin *reacția leucocitară mixtă (mixed leucocyte reaction)*

și SB care este identificat prin *tipizare limfocitară* sensibilizată *(primed lymphocyte typing)*.

C_2 și C_4, componente ale complementului și BF, sînt detectați serologic și funcțional.

Sistemul complement este un complex proteic alcătuit din aproximativ 20 de componente, denumite C_1 (format din trei proteine), C_2, C_3 pînă la C_9, properdin factorul B, factorul D și mai multe tipuri de proteine reglatoare. Proteinele componente ale complementului sînt solubile, au o greutate moleculară între 24 000 și 400 000 și circulă în sînge și lichidele extratisulare. Multe din ele sînt inactive, dar se pot activa secvențial sau în cascade atunci cînd sînt stimulate de reacții antigen-anticorp și determină distrugerea antigenului străin care a pătruns în organism. Se pot activa și cînd organismul a fost invadat de microorganisme patogene. Activarea în cascadă începe cu primele componente ale complementului (C_1, C_2, C_3, C_4, factorul B și factorul D). Multe din aceste prime componente sînt proenzime, activate secvențial prin clivaj proteolitic. Proenzima activată acționează în continuare ca enzimă asupra componentei următoare pe care o activează. Aceasta, la rîndul ei, acționează ca enzimă asupra componentei imediate care se activează. Astfel componentele complementului se activează în lanț.

Componentul principal din cascada proteolitică este C_3, activat prin enzima *C_3-convertaza*. Prin clivarea componentului C_3, care rămîne activ pe membrana celulară-țintă mai puțin de 1/10 m/sec, se formează două fragmente dintre care unul mai mare (C_3b), care se leagă de suprafața celulei-țintă lîngă C_3-convertaza și formează o enzimă mai mare — *C_5-convertaza* —, cu rol de a declanșa spontan activarea în lanț de la C_3 la C_5. Această activare a ultimelor componente ale complementului lucrează ca un conglomerat cu greutate moleculară de 2 milioane, de unde denumirea de *complex litic al complementului*. Aceste secvențe în lanț (unitate de reacții imune) poartă denumirea de *cale clasică de activare a complexului*. În contrast cu calea clasică de activare *(imunologică)*, există și calea alternativă de activare a complementului *(activare neimunologică)* și a sistemului properdinei din ser. Astfel sistemul complement poate acționa pe cont propriu sau în cooperare cu anticorpii în procesul de apărare împotriva microorganismelor ca bacterii, virusuri, fungi sau în cazul transfuziilor sanguine sau în terapia medicamentoasă. El este activat doar de anticorpii din clasa IgG și IgM legați de antigen. Cele mai puternice sînt subclasele IgG_1 și IgG_3. Complexele imune ca IgA, IgD, IgE nu au efecte activatoare asupra complementului (detalii în capitolul despre sînge).

Calea alternativă de activare a complementului poate fi folosită în absența anticorpilor. Se realizează prin polizaharidele prezente în învelișul celular al bacteriei, drojdie de bere și protozoare. Această cale este socotită a fi prima linie de apărare împotriva infecțiilor, înainte de a intra în acțiune răspunsul imun.

Se produce în acest caz o continuă activare în bloc a componentei C_3, factorului B și factorului D. Are loc o clivare a componentei C_3 cu producere continuă dar în concentrație mică de C_3b, care se prinde de anumite suprafețe, numite suprafețe activatoare. Prin legare de aceste suprafețe, C_3b este protejat și nu se inactivează. El formează pe aceste suprafețe un complex enzimatic cu factorul B și factorul D, respectiv 5-convertaza căii alternative. Aceasta servește ca moleculă declanșatoare a activării componentelor terminale ale

Scanned with OKEN Scanner

complementului (C_5—C_9), întocmai ca în calea clasică de activare, ducînd la liza celulară sau la ruperea lipoproteinelor membranei de suprafață.

Complexul major (genetic) de histocompatibilitate

Genele complexului HLA ocupă aproximativ 4 centimorgane (*cM*) pe brațul mic al *cromozomului 6*. cM este o unitate a distanței *(map)* fizice pe cromozomi, echivalent cu 1% din frecvența de recombinare dintre genele legate *(linked genes)*. Se mai numește și *„map unit"* (fig. 3.14).

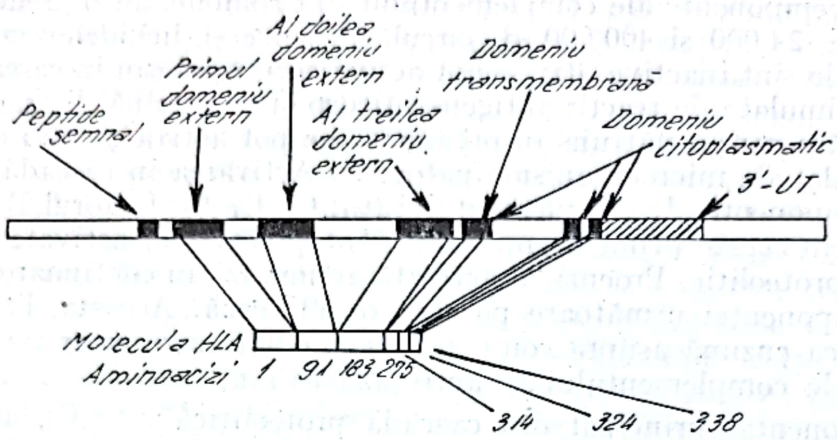


Fig. 3.14. — Reprezentarea schematică a genei genomului de HLA clasa I. Organizarea exonilor și intronilor.

Complexul H_2 de la șoarece are genele pe cromozomul 17. Structura genelor care determină clasa I de antigen de histocompatibilitate constă din 7 exoni sau regiuni ADN de translație, separate prin introni sau regiuni ADN netranslaționale. Există 3 loci genetici, respectiv exonii 2, 3, 4 pentru clasa I, ce corespund antigenelor HLA-A, HLA-D și HLA-C.

Din clasa a II-a de antigeni de histocompatibilitate sînt recunoscuți doi loci genetici, respectiv pentru HLA-D și HLA-DR, alcătuiți, ca și pentru cei din clasa I, de antigeni de histocompatibilitate, din exoni și introni (fig. 3.15). O serie de gene adiționale care determină alți aloantigeni (antigeni prezenți pe celulele indivizilor din aceeași specie) de histocompatibilitate din clasa a II-a, numite și Ia sau celule B, se găsesc fie lîngă, fie pe aceeași regiune cu HLA-DR. Astfel antigenii MB, MT și DS și alte gene care deter-

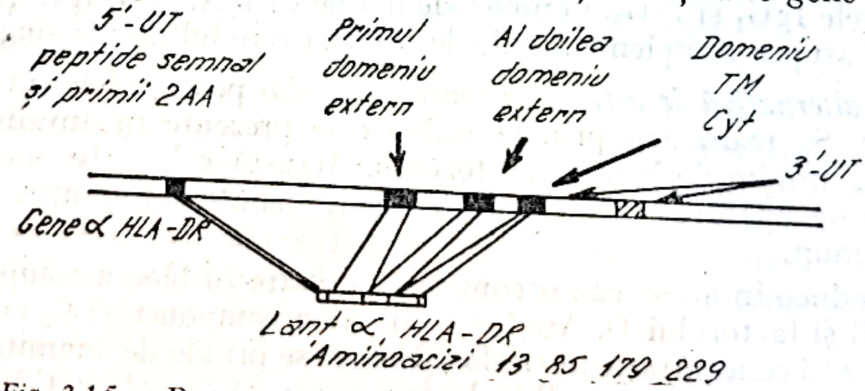


Fig. 3.15. — Reprezentarea schematică a genelor genomului HLA clasa a II-a. Organizarea exonilor și intronilor (HLA-DR alfa). *C'-UT* — regiune de netranslație; *5' — TM* — regiune transmembranară; *3'-UT* — regiune de netranslație; *Cyt* — domeniu citoplasmatic.

mină clasa a II-a de antigeni de histocompatibilitate, numite celule B secundare (SB), au fost mapate între HLA-DR și glioxilază. În complexul HLA au mai fost mapate regiuni pentru C_2 și C_4, precum și pentru factorul properdin B din complement.

În fiecare *locus* al unei gene au fost găsite mai multe forme *alternative de alele* (alelă = una sau două gene ce controlează o caracteristică particulară prezentă în *locus*). Avînd multiple și diferite alele, sistemul HLA este foarte polimorf (18 alele la locusul pentru HLA-A sau 32 de alele distincte la locusul pentru HLA-B).

Genele răspunsului imun (Ir = Immune response)

Unele răspunsuri dependente de limfocitele T sînt controlate de gene specifice, diferite de cele pentru anticorpi. Aceste gene au fost descoperite la vertebrate, mapate pe pozițiile ce determină formarea clasei a II-a de antigeni de histocompatibilitate. Se pare că Ir există și la om: astfel sensibilitatea la colagen pare a fi asociată cu HLA-DR 4 și apare secundar lipsei de limfocite T supresoare. Slaba sensibilitate la polenul de cedru, la antigenul schistosomal și la antigenul peretelui streptococului pare a fi legată de complexul HLA.

Bolile complexului HLA sînt în general puțin cunoscute. Doar cîteva sînt asociate cu anomaliile sistemului HLA. Astfel spondilita anchilozantă este asociată cu antigenul HLA-B 27, artrita reumatoidă cu HLA-DR 4, hemocromatoza idiopatică cu HLA-A 3, o anumită formă de artrită reumatoidă juvenilă este asociată cu halotipi ai complementului, sindromul Sjögren — cu MT-2. De asemenea cu HLA-DR 3 par să fie asociate o serie de boli autoimune ca: lupusul sistemic eritematos, sindromul Sicca, *miasthenia gravis*, dermatita herpetiformă, diabetul insulinodependent, boala Addison idiopatică, boala celiacă etc.

3.9.3. IMUNOGLOBULINELE (ANTICORPII)

Imunoglobulinele sînt molecule de glicoproteine heterogene (alcătuite din 82—96% polipeptide, 4—18% hidrați de carbon), care au proprietatea biologică de a acționa ca anticorpi, ce se unesc cu substanțe numite antigene, care determină formarea lor.

Imunoglobulinele reprezintă 20% din totalul proteinelor plasmei sanguine, dar pot fi prezente în concentrații diferite și în lichidele extravasculare, în secrețiile exocrine și la suprafața unor limfocite. Structura imunoglobulinelor a fost cunoscută prin disociere enzimatică în compuși mai mici sau prin studii monoclonale. Serul și urina bolnavilor cu mielom multiplu conțin proteine structural cromogene, care au fost denumite proteine monoclonale, deoarece sînt sintetizate de o singură clonă a plasmocitelor maligne. Cercetările asupra proteinelor monoclonale au permis să se studieze și să se cunoască secvența aminoacidă a moleculei imunoglobulinice. Mai mult, este posibil în prezent să se obțină cantități nelimitate de anticorpi monoclonali ai unui antigen specific, prin fuziunea celulei somatice a celulelor plasmocitului cu celulele normale, producătoare de anticorpi de la animalele imunizate. Anticorpii monoclonali rezultați din astfel de hibrizi celulari somatici *(hibridoame)* sînt larg folosiți ca reactivi de diagnostic.

Fiecare *moleculă de imunoglobulină sau anticorp* conține cel puțin o unitate de bază sau monomer, alcătuit din *patru lanțuri polipeptidice*, unite între ele prin interacțiuni necovalente și punți covalente disulfidice între reziduurile

Scanned with OKEN Scanner

cisteinei. Din cele patru lanțuri polipeptidice, două identice sînt numite *lanțurile L (Light)*, fiecare format din aproximativ 220 de aminoacizi, și alte două identice, numite *lanțurile H (Heavy)*, formate fiecare din aproximativ 440 de aminoacizi. Fiecare lanț polipeptidic conține o porțiune terminală amino-, numită *regiunea V* (variabilă și heterogenă), și o porțiune terminală carboxil, numită *regiunea C* (constantă).

În componența imunoglobulinelor polimere se găsește în mod normal și un *lanț polipeptidic J*, cu greutatea moleculară de aproximativ 15 000, care este o mică glicopeptidă bogată în acid aspartic și glutamic.

Coeficientul de sedimentare a imunoglobulinelor exprimate în valori Svedberg, se situează între 6 S și 19 S. Cu cît este mai mare valoarea S, cu atît greutatea moleculară a proteinelor apare mai ridicată.

Fiecare *lanț L* are o greutate moleculară de aproximativ 23 000 și este subdivizat în două tipuri, respectiv Kappa și Lambda, pe baza multiplelor diferențe structurale din regiunea C, care determină diferențele antigenice. Proporția celor două tipuri diferă de la o specie la alta, la om fiind în raport de Kappa/Lambda = 2/1. Aceeași moleculă de imunoglobulină conține întotdeauna lanțul Kappa și lanțul Lambda identice.

Lanțurile H au fost identificate la om sub formă de *5 tipuri*, cu diferențe structurale în regiunea C. Ele au fost numite Gamma, Alpha, Miu, Delta și Epsilon, avînd fiecare greutăți moleculare de 50 000—70 000.

Fiecare lanț polipeptidic din structura moleculelor de imunoglobuline este alcătuit din regiuni globulare numite *domenii*, fiecare cu 100—110 aminoacizi, care, în lanțurile H, sînt denumite V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}, iar în lanțurile L sînt denumite V_1 și C_1. Între domeniile C_{H1} și C_{H2} ale lanțurilor H și L se află o regiune specială, numită *regiunea „balama"*, care este mai flexibilă și mai expusă la acțiunea enzimelor (fig. 3.16).

Între domeniile C_{H1} și C_{H2} ale lanțurilor L și H polipeptidele imunoglobulinice mai prezintă și o porțiune mică de cîțiva aminoacizi în regiunea V_1 care leagă antigenii.

Moleculele de imunoglobuline sînt rupte de două enzime proteolitice, respectiv papaina și pepsina, în fragmente caracteristice. Astfel papaina, acționînd asupra regiunii „balama" a lanțurilor H, produce două fragmente

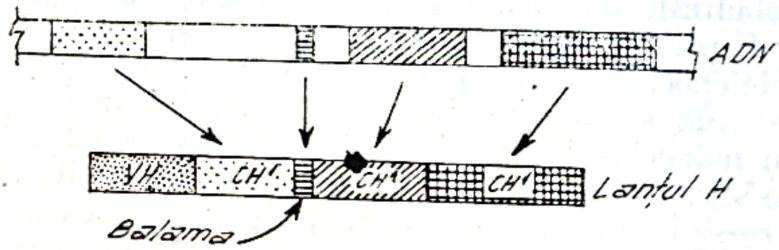


Fig. 3.16. — Cele trei domenii ale regiunii constante (*C*), din lanțul greu (*H*) și regiunea „balamalei".

identice dar separate, numite fragmentele *Fab (fragment antigen binding)*, fiecare avînd o poziție de legare a antigenului și un fragment *Fc* (fragment cristalizabil) (fig. 3.17). Pepsina produce o rupere a moleculei de imunoglobulină cu formarea unui *fragment F (ab')*$_2$, compus din două unități Fab neseparate. Ele rămîn legate prin punți covalente disulfidice, deoarece pepsina clivează aceste punți numai la capătul terminal carboxil al moleculei. Prin clivarea cu pepsină mai iau naștere și mici molecule peptidice.

Componența de hidrați de carbon a imunoglobulinelor este legată covalent de aminoacizii lanțurilor polipeptidice. Atașarea se face prin legătura N-glicozidică dintre N-acetilglucozamina lanțului de hidrat de carbon și reziduul de asparagină din lanțul polipeptidic, sau prin legătura O-glicozidică dintre lanțul oligozaharidic și reziduul serină al lanțului polipeptidic. Studii imuno-

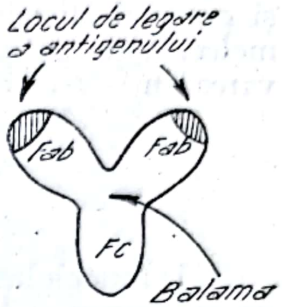
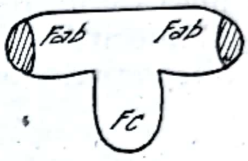


Fig. 3.17. — Reprezentarea schematică a imunoglobulinei G, ce are forma literei „Y". Ea conține o „balama" care conferă flexibilitate segmentară.



globulinice monoclonale au arătat că IgM și IgF au în general 5 oligozaharide fiecare, IgG are un oligozaharid iar IgA are 2—3 oligozaharide.

În general, hidrații de carbon se găsesc în lanțul J și în regiunile C ale lanțurilor H. Nu se găsesc în lanțurile L sau în regiunile V ale lanțurilor H. Funcția hidraților de carbon este mai puțin bine precizată; se pare că au rol în secreția imunoglobulinelor de către plasmocite și se asociază funcției regiunilor C din lanțurile H.

Cele cinci tipuri de lanț H determină împărțirea imunoglobulinelor în cinci clase: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE.

3.9.3.1. Imunoglobulina G (IgG)

Imunoglobulina G (IgG) reprezintă la adult cca 75% din totalul globulinelor serice. În cadrul IgG s-au evidențiat în concentrații diferite alte patru subclase. IgG_1 60—70%; IgG_2 14—20%; IgG_3 4—8% și IgG_4 2—6%. IgG este singura clasă de imunoglobuline care poate străbate placenta umană, protejează nou-născutul în primele luni de viață și este capabilă să fixeze complementul seric. Macrofagele prezintă receptori de suprafață care leagă IgG_1 și IgG_3, precum și fragmentele lor Fc. Legarea pasivă a anticorpilor pe receptorii Fc este responsabilă de activarea macrofagelor care vor acționa ulterior de o manieră citotoxică.

3.9.3.2. Imunoglobulina A (IgA)

Imunoglobulina A (IgA) se găsește predominant în secreții, având o greutate moleculară de aproximativ 400 000. IgA împiedică unele infecții locale; se află în cantitate mare în salivă, secreția lacrimală, bronșică și nazală, în lichidul prostatic, în secreția vaginală și secreția mucoasă a intestinului subțire.

Scanned with OKEN Scanner

3.9.3.3. Imunoglobulina M (IgM)

Imunoglobulina M (IgM) reprezintă cca 10% din imunoglobulinele normale avînd o greutate moleculară de aproximativ 900 000. IgM împreună cu IgD se află în cantitatea cea mai mare pe suprafața limfocitelor B, fiind și cea mai eficientă imunoglobulină în fixare a complementului. O singură moleculă de antigen legată de IgM este suficientă pentru a declanșa activarea în „cascadă" a complementului.

3.9.3.4. Imunoglobulina D (IgD)

Imunoglobulina D (IgD) este un monomer cu greutatea moleculară de aproximativ 180 000. Se găsește în ser, în cantități mici, reprezentînd 0,2% din totalul imunoglobulinelor serice. Se degradează relativ ușor sub acțiunea căldurii și enzimelor proteolitice. IgD cu IgM predomină pe suprafața limfocitelor B umane, ceea ce sugerează că IgD ar putea fi implicată în diferențierea acestor celule.

3.9.3.5. Imunoglobulina E (IgE)

Imunoglobulina E (IgE) are greutatea moleculară de aproximativ 190 000 și reprezintă doar 0,004% din totalul imunoglobulinelor serice. Prezintă o mare afinitate pentru mastocite și bazofile. IgE este un exemplu pentru natura bifuncțională a anticorpilor. *Alergen* este termenul folosit pentru un antigen care are capacitatea de a stimula producerea de IgE. Anticorpii IgE leagă alergenii prin porțiunea Fab. În mod normal IgE se prezintă numai sub formă de monomeri, întocmai ca și IgG și IgD.

3.10. ȚESUTURILE – CONCEPTUL ȘI CLASIFICAREA

Examinarea la microscopul optic a structurii corpului omenesc permite unei persoane avertizate să constate că multitudinea de celule (și elemente intercelulare) prezintă o varietate restrînsă de modele de organizare, ușor de distins, pe care le regăsim în alcătuirea tuturor organelor și sistemelor ce compun corpul. În mod curent, organizarea ordonată și caracterele distinctive ale grupării celulelor nu apar evidente la observația cu ochiul liber. Dispunerea organizată reflectă cooperarea celulelor în scopul efectuării unei funcții speciale. Cînd vorbim de agregate de celule organizate pentru a efectua o funcție comună, prin definiție ne referim la țesuturi. Cu toate că în mod curent spunem că celulele reprezintă unitatea funcțională a organismelor, în realitate, țesuturile sînt responsabile de menținerea funcțiunii metazoarelor superioare, deoarece ele reprezintă sinteza colaborării celulelor componente individuale. Mai mult, există specializări ale suprafeței celulare care sînt diferențiate tocmai pentru a efectua cooperarea intercelulară. Unele din aceste specializări — joncțiunile *communicans* — reprezintă dispozitive

Scanned with OKEN Scanner

care mijlocesc nu numai cuplarea electrică a celulelor, ci permit de asemenea și trecerea preferențială a unor mici molecule (îndeosebi a moleculelor biologic active) dintr-o celulă în cea alăturată (fig. 3.18).

Conceptul de țesut constituie o bază pentru recunoașterea numeroaselor tipuri (mai multe sute de tipuri) de celule ce compun corpul și pentru

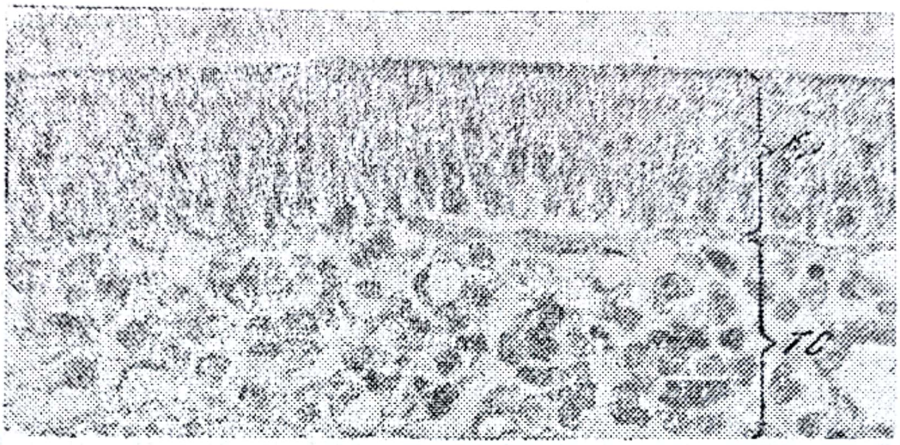


Fig. 3.18. — Comparația între un epiteliu (*Ep*) și țesutul conjunctiv (*TC*). De remarcat că epiteliul posedă o suprafață de care nu aderă celule sau elemente interstițiale. Aceasta este suprafața liberă a epiteliului. Mai mult, celulele epiteliale sînt asociate într-un strat compact. Nucleii lor sînt uniform repartizați. Celulele țesutului conjunctiv au aspecte diferite și sînt dispuse la întîmplare. Nucleii lor prezintă diferite forme și mărimi. Citoplasma celulelor este greu de deosebit și se confundă cu fibrele conjunctive interstițiale. Țesutul conjunctiv prezintă vase de sînge, pe cînd epiteliul este lipsit de vase. HE; X500.

înțelegerea felului în care ele conlucrează în organism. În ciuda variațiilor în aspectul general, în organizarea structurală și în însușirile funcționale ale diferitelor organe ce compun corpul, agregatele de celule care le compun pot fi reduse și clasificate în patru tipuri de *țesuturi fundamentale* sau de bază, și anume: *a) țesuturile epiteliale* (sau epiteliile); *b) țesuturile conjunctive*; *c) țesuturile musculare* și *d) țesutul nervos*. Fiecare din aceste țesuturi de bază se caracterizează printr-un set de însușiri morfologice generale și de proprietăți funcționale. Fiecare tip poate fi mai departe subdivizat, pornind de la unele caractere mai specifice ale diferitelor populații de celule (ca și ale substanțelor intercelulare, în cazul în care acestea prezintă însușiri speciale). Pentru a diferenția țesuturile de bază, au fost utilizați doi parametri: la baza definirii epiteliilor și țesuturilor conjunctive au stat în principal, caracterele lor morfologice, iar la baza definirii țesuturilor musculare și nervoase au fost luate în considerație în principal funcțiile acestora.

Epiteliile se caracterizează prin strînsa apoziție a celulelor componente și prin prezența unei polarizări sau suprafețe libere (fig. 3.19). O față liberă este aceea la care nu aderă elemente celulare sau extracelulare — de exemplu, suprafața externă a corpului sau cavitățile organelor interne. Epiteliile sînt subdivizate pe baza localizării, a formei și a aranjării celulelor componente.

Țesuturile conjunctive, spre deosebire de epitelii, sînt alcătuite din celule separate între ele de o cantitate remarcabilă și caracteristică de elemente intercelulare (fig. 3.20). Elementele conjunctive intercelulare sînt elaborate de celulele conjunctive. Celulele și materialul intercelular variază

de la un tip de țesut conjunctiv la altul. În consecință, la clasificarea țesuturilor conjunctive, se iau în considerare nu numai celulele, ci și compoziția și organizarea elementelor intercelulare. În figura 3.18 se pot remarca deo-

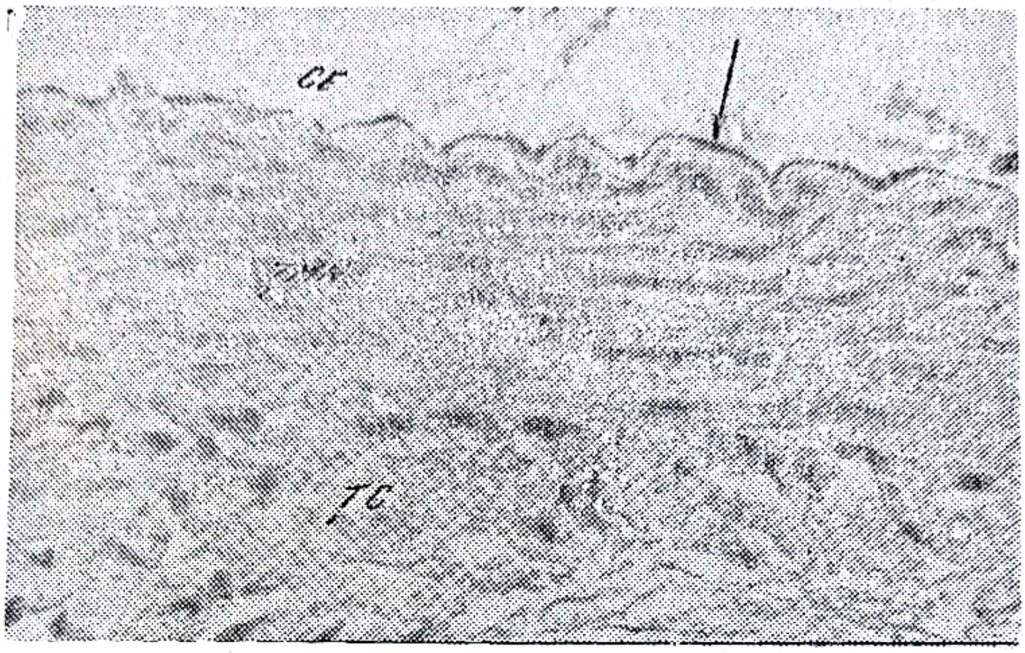


Fig. 3.19. — Secțiune transversală printr-o arteră de tip muscular. Peretele vasului este alcătuit în cea mai mare parte din celule musculare netede (*TN*), care au formă alungită. Ele sînt grupate una lîngă alta și circumscriu lumenul vasului. Nucleii (săgeți) sînt centrali și au aspectul de bastonaș. Lumenul vasului este căptușit de un rînd de celule turtite — celulele endoteliale (*CE*). Partea externă a peretelui vasului este constituită din țesut conjunctiv (*TC*). Celulele conjunctive sînt reprezentate prin nucleii lor intens colorați. Printre celulele conjunctive se disting fibrele conjunctive care sînt neregulat orientate. HE; X500.

Fig. 3.20. — Secțiune în țesut conjunctiv:
FC — fibră conjunctivă; *CC* — celulă conjunctivă; *CV* — capilar sanguin.

sebirile esențiale între epiteliu și țesutul conjunctiv subiacent. Trebuie remarcat îndeosebi aspectul celulelor în cele două tipuri de țesuturi.

Țesutul nervos este alcătuit din celule nervoase denumite neuroni și din celule asociate de diferite tipuri. În sistemul nervos central celulele asociate sînt denumite *nevroglii*, iar în sistemul nervos periferic, *celule Schwann*.

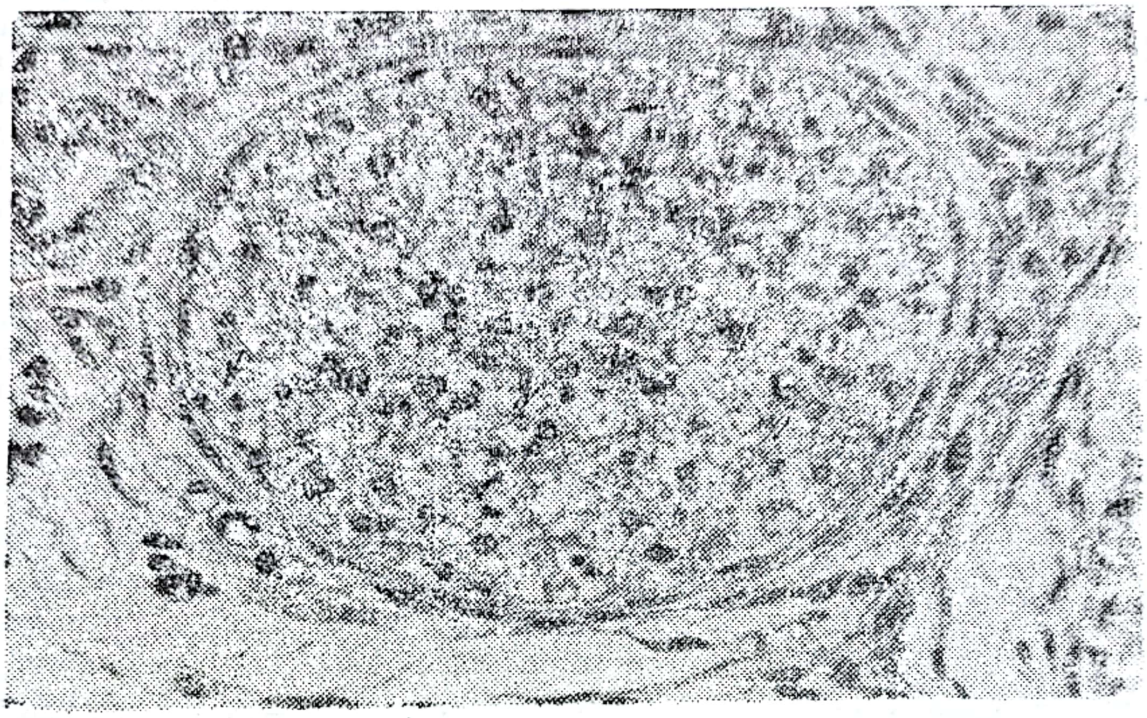


Fig. 3.21. — Secțiune transversală prin nerv. Partea principală a nervului este reprezentată de lungi fibre nervoase, de aspect filiform și, deoarece au fost secționate transversal, ele apar rotunjite. Elementele centrale, punctiforme, reprezintă fine prelungiri citoplasmatice sau axoplasma fibrelor nervoase. Materialul înconjurător clar este mielina, care formează un înveliș izolator specializat al axonului. Printre fibrele nervoase se remarcă nuclei mici (*N*) care aparțin celulelor satelite Schwann. HE; X500.

Cu toate că toate celulele prezintă proprietăți electrice, neuronii sînt înalt specializați pentru a transmite impulsul electric dintr-o parte a corpului în alta și pentru a integra astfel de impulsuri. Această capacitate funcțională este reflectată în morfologia neuronilor, în mod special în prelungirile citoplasmice care pornesc de la corpul celulelor — dendritele și axonii sau așa-numitele *fibre nervoase* —, precum și în legăturile sau *sinapsele* dintre aceste prelungiri. În secțiunile histologice obișnuite, țesutul nervos este reprezentat fie sub formă de *nervi*, ce constau din mai multe fibre nervoase înconjurate de celule de susținere, fie sub formă de *ganglioni*, în care sînt prezenți neuronii prin corpul celular (fig. 3.21 și 3.22).

Țesutul muscular este o altă categorie de țesut fundamental clasificat pe baza proprietății sale esențiale, și anume capacitatea celulelor sale de a se contracta. Aspectul majorității țesuturilor musculare permite, cu puține excepții, recunoașterea lor cu ușurință. În scopul alcătuirii unor unități contractile, celulele musculare sau fibrele musculare, așa cum sînt ele denumite în mod curent, tind să se dispună în fascicule care au un aspect caracteristic, în mod obișnuit foarte diferit de țesutul înconjurător. În figurile

Scanned with OKEN Scanner

3.19 și 3.23 sînt prezentate două tipuri de țesuturi musculare, *neted* și *striat*. Se poate observa că celulele sînt orientate în aceeași direcție, după aranjarea nucleilor lor. Cu toate că celulele ce compun cele două tipuri de țesuturi

Fig. 3.22. — O secțiune printr-un microganglion nervos din musculara unui organ cavitar. Principalele elemente componente sînt celulele nervoase, relativ mari (în chenar punctat corpul celulei nervoase) care cuprind o citoplasmă bogată și intens colorată și un nucleu mare, eu cromatic (săgeți), cu un nucleol evident. Corpul celulei nervoase este înconjurat de celule-satelite, strîns alăturate, cărora nu li se disting decît nucleii (*N*). De asemenea sînt prezente și fibre nervoase cu aspect ondulat, nemielinizate și foarte subțiri. HE; X 400.

Fig. 3.23. — Secțiune longitudinală în țesutul muscular scheletal. Elementele musculare au formă cilindrică, sînt groase, au numeroși nuclei așezați la periferie și prezintă striații transversale. Printre fibrele musculare se remarcă o cantitate mică de țesut conjunctiv cu celule rare și cu fibre conjunctive. Din loc în loc în țesutul conjunctiv se află și capilare sanguine.

FM — fibră musculară striată; *CS* — capilar sanguin; *TC* — țesut conjunctiv. HE; X 320.

Scanned with OKEN Scanner

musculare au aspecte morfologice foarte diferite, ele prezintă totuși un caracter esențial comun, și anume o mare parte din citoplasma lor este ocupată de un material de aspect fibrilar, eozinofil, așa-numitul aparat contractil. Aparatul contractil este alcătuit de actină și miozină, care edifică formațiunile fibrilare caracteristice pentru celulele musculare.

Fixînd bine în minte cîteva fapte esențiale și conceptele asupra țesuturilor de bază, examinarea și interpretarea lamelor histologice poate fi mult ușurată. Primul obiectiv este acela de a cunoaște felul în care sînt asociate celulele în țesutul respectiv și de a le determina caracterele speciale. Prezintă celulele respective o suprafață? Celulele se află în asociație strînsă una cu alta sau sînt separate între ele de un material intercelular anumit? Este posibil ca grupul întreg de celule să aibă o proprietate specială ca aceea a mușchilor sau a neuronilor?

Elementele caracteristice fiecăruia din țesuturile fundamentale și relațiile acestora cu funcțiile lor vor fi descrise în capitolele următoare. Este important de știut că insistînd asupra unui singur țesut specific, într-un anumit sens, separăm în mod artificial componentele tisulare dintr-un anumit organ. Cu toate acestea, trebuie subliniat că nu este posibilă înțelegerea histologiei diferitelor organe sau mecanismul prin care ele operează ca unități funcționale decît după ce se ajunge la buna stăpînire a cunoștințelor despre fiecare din țesuturile fundamentale și subtipurile acestora.

BIBLIOGRAFIE

1. BALTIMORE D. — Retroviruses and Retrotransposomes, *Cell*, 1985, *40*, 481—482.
2. BISHOP J. M. — Viral Oncogenes, *Cell*, 1985, *42*, 23.
3. BODMER W. — The HLA System Introduction, *Brit. med. Bull.*, 1978, *34*, 213.
4. BROWN E. și colab. — Springer Semin. Immunopathol., 1984, 6, 349—22, 67.
5. COURTY J. și colab. — Propriétés *in vitro* de quelques facteurs de croissance et effets *in vivo*, *Biochimie*, 1984, *66*, 419—428.
6. LE DOUARIN N.M. — Cell Migrations in Embryos, *Cell*, 1984, *38*, 353—360.
7. EDELMAN G. M. — Cell Adhesion and the Molecular Processes of Morphogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, *54*, 135—169.
8. FOLKMAN J. — The Vascularization of Tumors, *Scient. Ann.*, 1976, 59—73.
9. GOODMAN J. — The Antigens, Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1975.
10. KINGSTON R., BALDUIN A. și colab. — Transcription Control by Oncogenes, *Cell*, 1985, *41*, 3.
11. MARX J. — Oncogenes in Neural Tumors, *Science*, 1984, 224, 1088.
12. OPPENHEIM J., COHEN S. — Interleukins, Lymphokines and Cytokines, Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1983.
13. PANGANIBAN A. — Retroviral DNA Integration, *Cell*, 1985, 42, 6.
14. PATTEN C. S. — Stem Cells, Churchill Livingstone, Londra, 1983.
15. SLITES D., STOBO J. și colab. — Basic and Clinical Immunology, Edit. Lange Medical Publ., Los Altos, 1984.
16. SUTCLIFFE J. G. și colab. — Control of Neuronal Gene Control, *Science*, 1984, 225, 1308—1315.
17. STERN C. D. — Hyaluronidases in Early Embriyonic Development, *Cell. Biol. Int. Rep.*, 1984, 8, 703—717.
18. YAMANDA K. M. — Cell Surface Interactions with Extracellular Materials, *Ann. Rev. Biochem.*, 1983, *52*, 761—799.

Scanned with OKEN Scanner

ȚESUTURILE EPITELIALE

4.1. GENERALITĂȚI

Mediul fluid este indispensabil vieții celulelor, de la primele forme de viață celulară, ce pluteau în oceanul primitiv și pînă la celulele organismului uman, scăldate de fluidele ce compun mediul intern *.

Homeostazia mediului intern și realizarea autonomiei organismului reprezintă rolul fundamental al țesutului epitelial, care separă mediul extern de mediul intern și asigură compartimentarea mediului intern în domenii de compoziție distinctă. Pe de altă parte, țesutul epitelial realizează legătura selectivă dintre aceste compartimente. Pentru a îndeplini aceste funcții, epiteliile sînt alcătuite din straturi continue de celule poliedrice, strîns atașate între ele, cu puțină substanță intercelulară (neobservabilă la microscopul optic), care acoperă suprafața corpului sau îi căptușesc cavitățile, numite, din acest motiv, epitelii de acoperire.

Citoplasma celulelor epiteliale conține un tip specific de proteine, numite citokeratine.

Unele celule epiteliale sînt grupate în formațiuni glandulare (tubi, acini etc.), care păstrează legătura cu suprafața epiteliilor de acoperire din care derivă, printr-un duct. Ele au proprietatea de a secreta diferite substanțe pe care le eliberează la suprafața epiteliilor prin ductul excretor — secreție exocrină. Alte celule epiteliale secretorii sînt compact grupate, în strînsă vecinătate cu capilarele sanguine, formînd glande care își varsă secreția în sînge, trecînd prin fluidul extracelular — secreția endocrină.

Cu o singură excepție (stria vasculară a epiteliului canalului cohlear), epiteliile nu sînt vascularizate, vasele de sînge aflîndu-se totdeauna în țesutul conjunctiv subiacent.

Toate epiteliile au o față așezată pe o membrană bazală, iar o alta, marginea lor apicală, prezintă specializări de suprafață. Ele sînt structuri polarizate.

---

* Compoziția ionică a mediului intern este calitativ similară cu cea a apei mării.

Scanned with OKEN Scanner

Funcțiile îndeplinite de epitelii pot fi schematizate astfel: *a)* acoperirea suprafeței corpului (epidermul) și căptușirea cavităților (exemplu: epiteliul organelor cavitare); *b)* transportul selectiv de substanțe (exemplu: epiteliul intestinal, epiteliul alveolar, epiteliul urinar); *c)* secreția exocrină sau endocrină (glandele exocrine și endocrine): *d)* recepția senzorială (exemplu: epiteliul olfactiv, mugurii gustativi); *e)* contractilitatea (celulele mioepiteliale).

Un epiteliu poate îndeplini una sau mai multe dintre funcțiile menționate.

4.1.2. NOMENCLATURĂ ȘI ETIMOLOGIE

Semnificația etimologică a termenului de epiteliu este cea de acoperiș peste ridicături sau mameloane (gr.: *epi* = peste; *thele* = ridicătură sau mamelon). Inițial, termenul de *epithelium* a fost utilizat pentru a desemna membrana prin transparența căreia se proiectează micile papile de țesut conjunctiv, bogate în capilare sanguine, de la nivelul buzelor, care le dau acestora culoarea caracteristică, roșie. Ulterior, termenul de *epithelium* s-a extins, căpătînd accepțiunea de astăzi.

Membranele epiteliale, sau epiteliile, împreună cu numeroasele glande care se dezvoltă din acestea, constituie țesuturile epiteliale. În mod convențional, membranele epiteliale care delimitează cavitățile — abdominală, pleurală, pericardică — sînt denumite mezotelii (gr.: *mezon* = din mijloc). Cele din interiorul cordului, vaselor sanguine și vaselor limfatice sînt denumite *endotelii* (gr.: *endon* = înăuntru). Mezoteliile și endoteliile, fiind alcătuite din straturi continue de celule strîns alăturate, sînt membrane epiteliale tipice, în ciuda denumirii lor speciale intrate în uzul curent.

4.1.3. HISTOGENEZA

Epiteliile derivă din toate cele trei foițe embrionare primitive.

4.1.3.1. Ectodermul

Ectodermul dă naștere la: *a)* epiderm și toate derivatele sale (fir de păr, unghie, glande sudoripare, glande sebacee, parenchimul și ductele glandei mamare; *b)* epiteliul senzorial al urechii interne, retina, mucoasa olfactivă; *c)* glanda pituitară; *d)* medulosuprarenala; *e)* epiteliul cornean și epiteliul cristalinian, *f)* organul smalțului și smalțul dintelui.

4.1.3.2. Mezodermul

Mezodermul dă naștere la: *a)* epiteliile rinichiului și ale gonadelor; *b)* mezoteliu, adică epiteliul ce căptușește cavitatea pericardică pleurală și peritoneală; *c)* endoteliu, adică epiteliul ce căptușește vasele sanguine și limfatice; *d)* corticosuprarenala. Trebuie subliniat faptul că din mezoderm derivă multe epitelii cu caracteristici speciale. De exemplu, celulele corticosuprarenalei, celulele Leydig din testicul, celulele luteale din ovar

Scanned with OKEN Scanner

(toate fiind componente endocrine) nu au o suprafață liberă — o trăsătură neobișnuită în cazul epiteliilor. Celulele secretorii menționate se diferențiază din celulele mezenchimale (mezenchim = țesutul conjunctiv nediferențiat embrionar), localizat profund. Procesul de diferențiere implică agregarea acestor celule mezenchimale pentru a forma aglomerări epiteliale. Totuși, celulele diferențiate nu ajung să capete o localizare de suprafață. Endoteliul * și mezoteliul au o suprafață liberă, dar diferă de epiteliile derivate din celelalte două foițe embrionare prin aceea că neavînd continuitate sau comunicare cu exteriorul, suprafața lor liberă vine în contact cu mediul intern.

4.1.3.3. Endodermul

Endodermul dă naștere la: *a)* epiteliul sistemului respirator, cu excepția mucoasei nazale, de origine ectodermică; *b)* epiteliul tubului digestiv, cu excepția epiteliului cavității bucale și al canalului anal, care sînt de origine ectodermică; *c)* epiteliul tuturor organelor și glandelor asociate tubului digestiv ca: ficat, pancreas, veziculă biliară; *d)* glanda tiroidă și glanda paratiroidă; *e)* epiteliul cavității timpanice și al tubei auditive; *f)* epiteliul timusului. Tiroida și paratiroida, spre deosebire de celelalte glande endocrine care derivă din mezenchim, se dezvoltă ca o expansiune epitelială a peretelui faringian, care, în cursul dezvoltării, pierde legătura cu locul său de origine. În mod similar, timusul se formează ca o expansiune epitelială a peretelui faringian, se dezvoltă în mediastin, apoi își pierde legăturile cu locul de origine.

4.1.4. DEFINIȚIE

Epitelii sînt acele țesuturi de o mare diversitate histogenetică și structurală, dar avînd drept caracter *morfologic* comun faptul că sînt alcătuite din agregate strînse de *celule poliedrice, bogate în citokeratine*, iar ca *însușire fundamentală*, aceea de a realiza și controla homeostazia mediului intern, precum și a autonomiei mediului organismului față de mediul extern. Conform acestei definiții, în cadrul țesuturilor epiteliale se cuprind atît *epiteliile de acoperire* cît și *epiteliile glandulare* cu secreție externă sau internă.

4.2. CLASIFICAREA EPITELIILOR

Așa cum am menționat, epiteliile se clasifică după structura și funcția lor dominantă, în două grupe principale: *epitelii de acoperire* și *epitelii glandulare*. Aceasta este o împărțire arbitrară, deoarece există epitelii de acoperire în care toate celulele secretă mucus (exemplu: epiteliul gastric) ori în

* Endoteliul are o funcție de epiteliu de acoperire a suprafeței interne a peretelui vaselor. Datorită originii sale mezenchimale și proprietăților sale, celula endotelială este considerată în ultimul timp celulă conjunctivă. Conform acestei orientări, ea va fi descrisă la celulele țesutului conjunctiv.

Scanned with OKEN Scanner

care celulele glandulare sînt dispersate (exemplu: epiteliul oviductului, epiteliul intestinal, epiteliul traheal). Se mai pot menționa două alte tipuri de epitelii: *celulele epitelio-senzoriale* sînt celule de origine epitelială specializate în funcția senzorială (exemplu: celulele mugurilor gustativi); *celulele mioepiteliale*, specializate în contracție (prezente în glandele exocrine).

4.2.1. EPITELIILE DE ACOPERIRE

Epiteliile de acoperire sînt țesuturi alcătuite din celule organizate în straturi care acoperă suprafața sau căptușesc cavitățile corpului. Ele pot fi clasificate după numărul straturilor în: *epitelii simple*, alcătuite dintr-un singur strat de celule, *epitelii stratificate*, ce conțin mai multe straturi (tabelul 4.I) și *epitelii pseudostratificate*, care conțin un singur strat de celule cu înălțimi diferite.

TABELUL 4. I

Tipurile comune de epitelii de acoperire din corpul uman

După numărul straturilor	După forma celulelor	Exemple de localizare	Funcții
Simple (un strat)	Scuamos	Endoteliile și Mezoteliile	— Facilitează mișcările viscerelor (mezoteliile) — Transportul activ prin pinocitoză (endoteliile)
	Cuboid	Ductele excretorii ale glandelor salivare Suprafața ovarului Tubii contorți distali	Acoperire, secreție
	Columnar	Epiteliul intestinal Epiteliul veziculei biliare	Protecție, lubrifiație, absorbție, secreție
Pseudostratificat (straturi de celule cu nucleii la diferite niveluri; nu toate celulele ajung la suprafață dar toate aderă la membrana bazală)		Epiteliul traheal, bronșic și al cavității nazale Epiteliul epididimar Epiteliul canalului deferent	Protecție, transportul particulelor în afara căilor respiratorii, secreție
Stratificate (două sau mai multe straturi)	Scuamos (keratinizat uscat)	Epidermul	Protecție, prevenirea pierderii apei
	Scuamos (nekeratinizat, moale)	Gură, esofag, laringe, vagin, canalul anal	Protecție, prevenirea pierderii apei
	Cuboidal	Celulele foliculare din foliculii ovarieni, canalele glandelor sudoripare	Protecție, secreție
	Tranzițional	Vezica urinară, ureterul, calicele renale, bazinetul	Protecție, distensibilitate
	Columnar	Conjunctiva oculară	Protecție

Scanned with OKEN Scanner

4.2.1.1. Epiteliile simple

Epiteliile simple pot fi, după forma celulelor, *scuamoase* (sau pavimentoase), *cuboidale* și *columnare* (cilindrice, prismatice). Endoteliul ce căptușește vasele sanguine și mezoteliul sînt exemple de *epitelii simple scuamoase* (fig. 4.1). Deși celulele endoteliale și cele mezoteliale au același aspect la microscopul optic, ele nu trebuie considerate ca fiind același tip de celulă, întrucît diferă atît ca origine embriologică cît și ca reacție patologică. Ele reacționează diferit la agresiuni și, în cazul proliferării maligne, produc tipuri diferite de tumori.

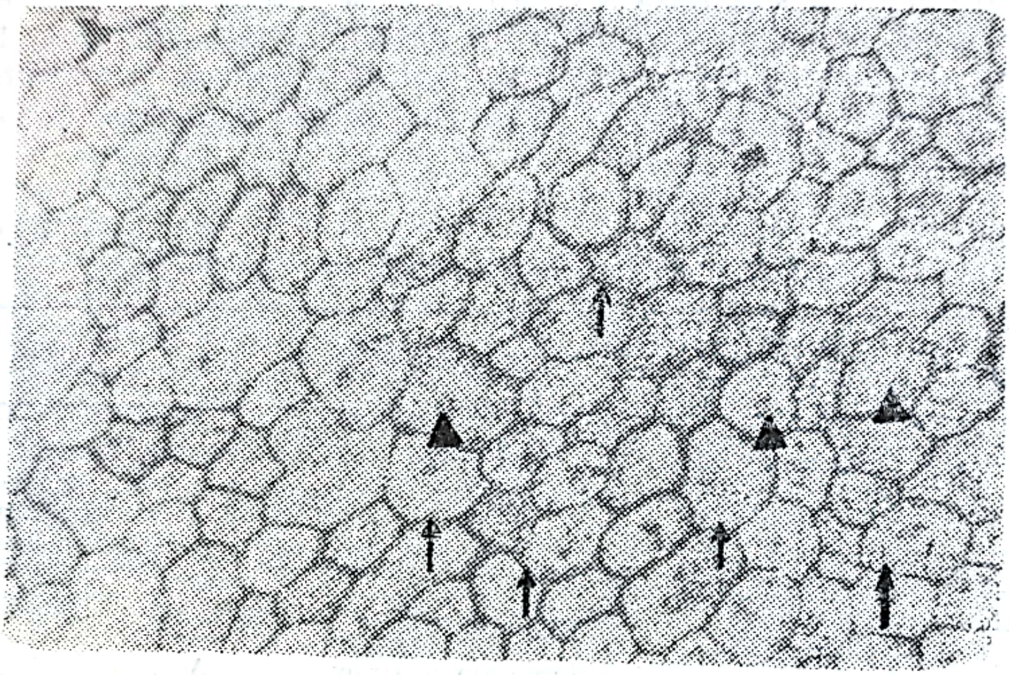


Fig. 4.1. — Epiteliu unistratificat pavimentos (impregnație argentică; X400). Sînt evidente limitele intracelulare (→) și nucleii (▲).

Fig. 4.2. — Epiteliu simplu cubic. Plex coroid. HE X320.

Scanned with OKEN Scanner

Un exemplu de epiteliu simplu cuboidal este cel de la suprafața ovarului sau al plexului coroidal (fig. 4.2), iar un exemplu de *epiteliu simplu columnar* este cel intestinal (fig. 4.3).

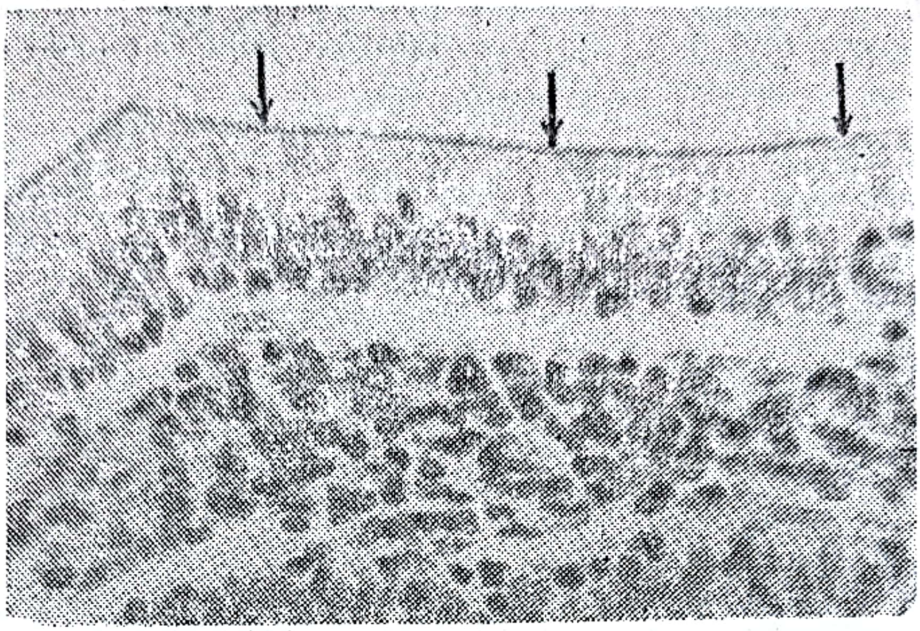


Fig. 4. 3. — Epiteliu cilindric simplu cu plăcuță striată (intestin, HE; X500). Se observă între enterocite celule caliciforme (săgeți).

4.2.1.2. Epiteliile stratificate

Epiteliile stratificate se clasifică, după forma celulelor din stratul superficial, în: epitelii *scuamoase, cuboidale, columnare* și *epiteliu tranzițional.*

4.2.1.2.1. Epiteliul stratificat pavimentos keratinizat

Epiteliul stratificat pavimentos keratinizat se află la suprafața pielii. Celulele sale sînt așezate pe mai multe straturi: celulele de pe membrana bazală sînt cuboidale sau columnare, straturile intermediare conțin celule poliedrice și treptat, spre suprafață, celulele devin din ce în ce mai turtite, iar la suprafață sînt scuamoase și se keratinizează. Acest epiteliu poartă și denumirea de epiderm (fig. 4.4).

Dacă vom examina epidermul de pe fața dorsală a mîinii, de exemplu, vom remarca că el este uscat, în ciuda faptului că sub el, în derm, se află numeroase vase sanguine și un bogat fluid în matricea conjunctivă extracelulară. Cu alte cuvinte, epidermul este un țesut epitelial impermeabil la apă. Dacă se depune o picătură de apă pe dosul mîinii, ea rămîne pe loc fără a pătrunde în piele. Dacă raclăm epidermul ușor, scuame foarte fine se desprind la de suprafața sa. Impermeabilitatea, rezistența la frecare și capacitatea de a se descuama sînt proprietăți ale straturilor externe ale epidermului. Epidermul este constituit din straturi celulare, în număr variabil, după regiunea corpului, dar prezentînd aceeași evoluție histofiziologică. Această evoluție antrenează formarea de straturi ordonate (vezi fig. 4.4 și 4.48 A), caracteristice, alcătuite în principal din celule denumite *keratinocite*. Pe lîngă keratinocite, în epiderm se mai află încă trei tipuri de celule, și anume: *me-*

Scanned with OKEN Scanner

lanocite, *celulele Langerhans* și *celulele Merkel*, care fiind reduse ca număr și răspîndite printre celulele principale, nu influențează stratificarea epidermului.

Stratul germinativ. Cel mai profund strat al epidermului este alcătuit dintr-un singur rînd de celule columnale sau cuboidale. El este denumit

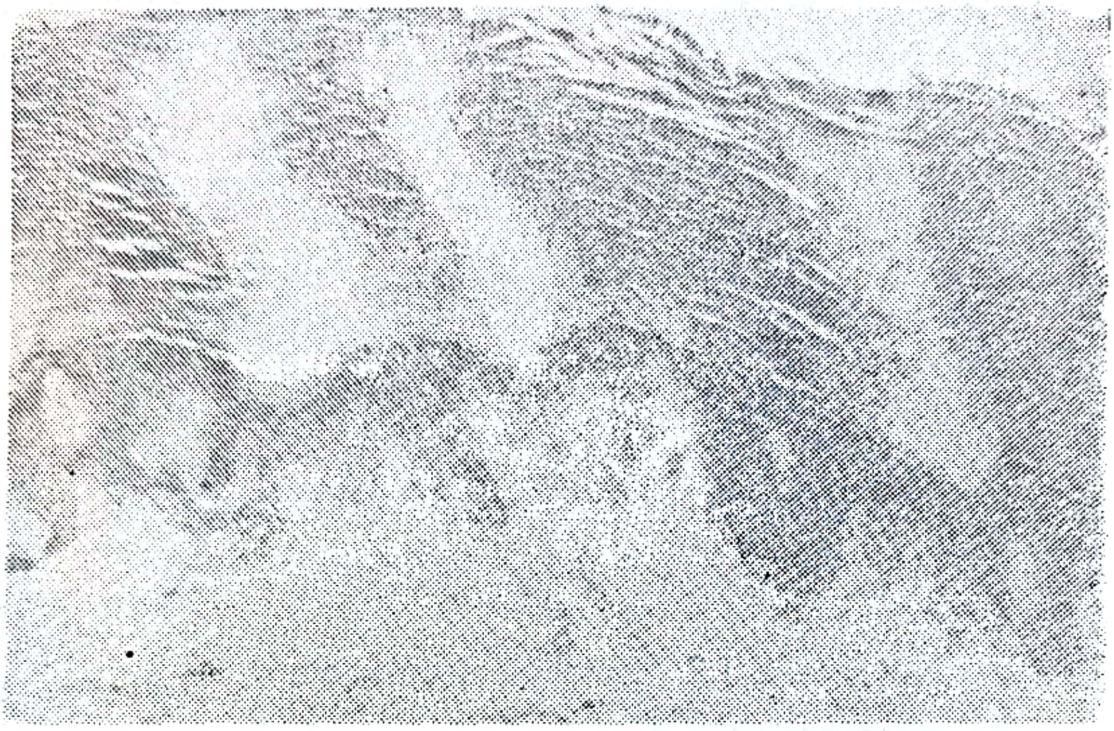


Fig. 4. 4. — Epiteliu pluristratificat pavimentos keratinizat (epiderm, HE; X125).

stratum germinativum pentru că din el, prin mitoză, iau naștere noi keratinocite, care, pe măsură ce încep să se diferențieze, trec în straturile superficiale. Astfel, diviziunile mitotice pot fi observate numai în acest strat. O altă denumire obișnuită este aceea de *strat bazal*, care indică așezarea sa în contact direct cu membrana bazală. Celulele sale sînt legate de membrana bazală prin intermediul hemidesmozomilor, iar între ele, prin desmozomi.

Stratul spinos. Spre deosebire de stratul germinativ, stratul spinos este alcătuit din mai multe rînduri de celulele de formă poliedrică. Datorită numeroșilor desmozomi (dispozitive de joncțiune intercelulară), pe care se inseră pachete de tonofibrile observabile și la microscopul optic, keratinocitele acestui strat au o suprafață de aspect spinos, de unde provine și denumirea lui.

Stratul granulos. Acest strat este alcătuit doar din cîteva rînduri de celule turtite (în formă de paviment), care conțin granule bazofile caracteristice. Cunoscute sub denumirea de granule de *keratohialină*, ele au fost considerate ca reprezentînd sursa componentei proteice amorfe a *keratinei moi*, care este forma caracteristică a keratinei din piele (spre deosebire de *keratina dură* din fanere).

Stratul lucid. Deasupra stratului granulos, în unele regiuni ale epidermului se află *stratum lucidum*, format din cîteva rînduri de celulele de aspect clar (contrastînd cu stratul granulos, prin dispariția bruscă a granulelor bazo-

file). Celulele acestui strat sînt strîns împachetate și degenerate, cu nucleii pe cale de degenerare prin carioliză. Celulele, foarte turtite, constau în esență din membrana celulară îngroșată, care delimitează keratina fibroasă, complexată cu proteina amorfă care și-a pierdut bazofilia.

Stratul cornos. În final, keratinocitele ajung la stratul cornos *(stratum corneum)* sau stratul keratinos de la suprafața epidermului, fiind denumite *celule cornoase* sau *corneocite.* În acest strat, celulele sînt turtite, anucleate, cu citoplasma ocupată de o scleroproteină filamentoasă, birefringentă, denumită keratină și membrana îngroșată, de cca 15 nm. Aceste celule sînt solidarizate printr-un material intercelular, sintetizat în paralel cu keratina, pentru a cimenta membranele corneocitelor. Suprafața stratului cornos este supusă în mod constant frecării și deci pierderilor prin descuamare. Pierderile prin descuamare sînt înlocuite prin diviziunile celulelor din stratul bazal.

4.2.1.2.2. Epiteliul stratificat pavimentos mucos

Epiteliul stratificat pavimentos mucos delimitează cavitățile umede (cavitatea bucală, esofagul, cavitatea vaginală), spre deosebire de piele, a cărei suprafață este uscată. Structural, epiteliul stratificat mucos este identic cu epiteliul stratificat keratinizat, cu excepția celulelor de la suprafață care mor fără să se keratinizeze și se exfoliază (fig. 4.5).

Fig. 4. 5. — Epiteliu pluristratificat pavimentos nekeratinizat de tip moale (bucal) (limbă, HE; X500).

Scanned with OKEN Scanner

4.2.1.2.3. Epiteliul stratificat columnar

Este rar. El este prezent la om în conjunctiva oculară și în canalele excretorii ale unor glande exocrine.

4.2.1.2.4. Epiteliul tranziţional

Epiteliul vezicii urinare și al ureterului care este supus unor modificări importante în cursul variațiilor de volum ale organelor respective, poartă denumirea de epiteliu tranziţional (fig. 4.6). Volumul vezicii urinare poate

Fig. 4. 6. — Epiteliu tranziţional (vezică urinară, HE; X400).

varia de la 500 ml (destinsă), la mai puțin de 50 ml (goală). Aceste schimbări volumetrice implică o modelare a suprafeței interne, care este efectuată de lunecarea celulelor epitaliale superficiale, în așa fel încît epiteliul tranziţional destins este alcătuit doar din cîteva straturi de celule, în vreme ce în condiții de colabare, este alcătuit din cel puțin 10 straturi. Celulele situate în profunzime, în vecinătatea membranei bazale, sînt mici, în timp ce celulele superficiale sînt mai mari și de aspect umbeliform. Sub celulele umbeliforme se află celule în formă de rachetă. De îndată ce mărimea vezicii crește, numărul straturilor celulare se reduce și celulele devin în general mai turtite. Între celule se găsesc puțini desmozomi, pentru ca procesul de alunecare a celulelor să se desfășoare relativ ușor. Tranziția de la un aspect al straturilor celulare la altul, care survine rapid cînd vezica se umple, conferă denumirea acestui tip de epiteliu.

Scanned with OKEN Scanner

4.2.1.3. Epiteliul pseudostratificat

Epiteliul pseudostratificat este denumit astfel, pentru că, deși nucleii par așezați în straturi diferite, există un singur rînd de celule care se sprijină toate pe membrana bazală; ele au însă înălțimi diferite, așa încît unele nu ajung la suprafață (fig. 4.7). Exemple: epiteliul pseudostratificat cilindric ciliat din căile respiratorii; epiteliul pseudostratificat cilindric cu streocili din căile genitale masculine.

Fig. 4. 7. — Epiteliu pseudostratificat cilindric ciliat (trahee, HE; X500;).

4.2.2. EPITELIILE GLANDULARE

Epiteliile glandulare au ca proprietate principală secreția.

Glandele se clasifică după un criteriu morfologic (prezența sau absența unui duct excretor), din care derivă un criteriu funcțional: locul unde acestea își varsă produsul de secreție. Ele sînt clasificate în două grupe: *a) glandele exocrine* se dezvoltă inițial ca un mugure care pornește din lama epitelială, apoi își creează un lumen, în care se adună produsul de secreție. El rămîne legat de epiteliu prin intermediul unui canal, prin care își varsă produsul de secreție la suprafața acestuia (fig. 4.8); *b) glandele endocrine* se dezvoltă în general în același fel, însă le lipsesc canalele de excreție, ele pierzînd orice legătură cu suprafața epiteliului din care au luat naștere (vezi fig. 4.8). Glandele endocrine sînt astfel organizate, încît celulele se găsesc în imediata vecinătate a capilarelor sanguine, în care își varsă produsul de secreție.

Majoritatea glandelor sînt multicelulare, dar există și celule glandulare izolate, ca de exemplu, celulele caliciforme, care secretă mucus la suprafața unor epitelii (intestinal, traheal), considerate de aceea *glande exocrine unicelulare* (vezi fig. 4.3).

Scanned with OKEN Scanner

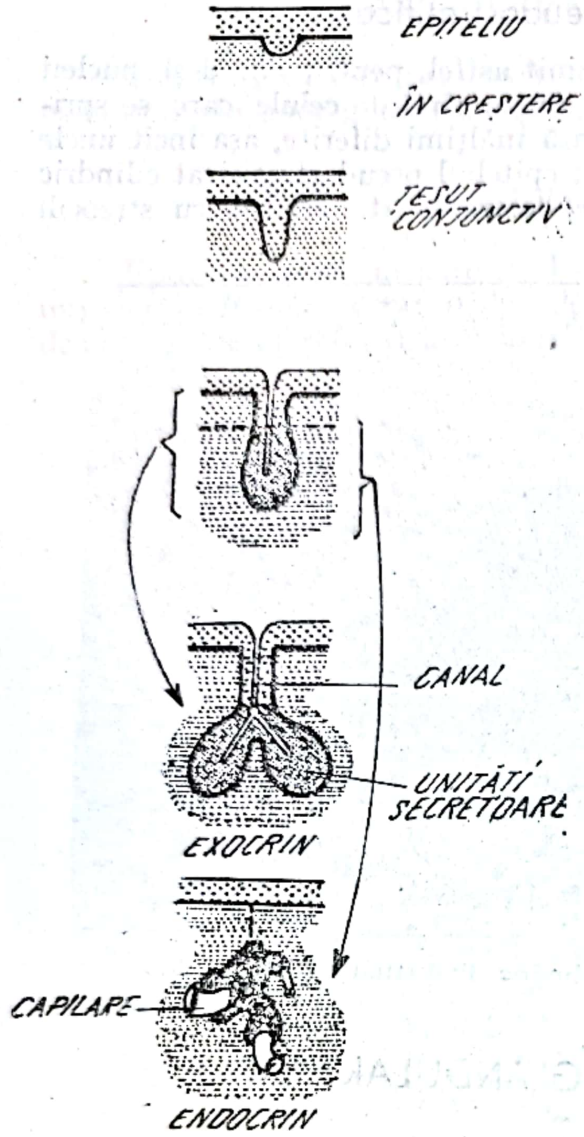


Fig. 4.8. — Dezvoltarea epiteliilor glandulare: *A*—canal excretor; *B*—unități secretorii.

4.2.2.1. Glandele exocrine

Glandele exocrine sînt alcătuite din unități secretorii, canale excretorii și din țesut conjunctiv distribuit printre elementele constitutive. O unitate secretorie este un grup de celulele epiteliale secretorii care delimitează un lumen, iar canalul excretor este un conduct epitelial rectiliniu care transportă produsul de secreție de la unitatea secretorie la suprafața unui epiteliu de acoperire. În unele cazuri, canalele pot modifica concentrația sau compoziția secreției, în cursul deplasării acesteia prin calalul respectiv, celulele lor avînd deci și funcție de absorbție sau secreție.

În tabelul 4.II sînt prezentate patru criterii folosite în mod curent pentru clasificarea glandelor exocrine. Mai întîi, distincția poate fi făcută ținînd seama dacă ductele excretorii sînt ramificate sau nu. Glanda care are un singur canal neramificat este denumită *glandă simplă*, în timp ce o glandă cu un sistem de canale ramificate, în formă de arbore, care drenează mai multe unități secretorii, este o *glandă compusă*. Glanda sudoripară din piele este o glandă simplă, iar pancreasul exocrin — o glandă compusă tipică.

Glandele exocrine pot fi clasificate după *forma unităților* lor secretorii.

TABELUL 4.II

Criteriile folosite pentru clasificarea glandelor exocrine

Tipul canalului excretor	Forma unităților secretorii	Tipul de secreție	Mecanismul secreției
Glande simple (canal neramificat)	tubulare	seroase	merocrine
Glande compuse (canal ramificat)	acinoase (alveolare)	mucoase	apocrine
	tubuloalveolare (tubuloacinoase)	mixte	holocrine

Scanned with OKEN Scanner

Glandele cu unități secretorii tubulare sînt denumite *glande tubulare*, iar glandele cu unități secretorii sferice sau în formă de bidon sînt denumite *acinoase* (lat. *acinus* = boabă de strugure), sau *alveolare* (lat. *alveolus* = mic sac gol). În general, toate aceste unități secretorii în formă de saci sau sferice sînt denumite *alveole*, cu excepția pancreasului și a glandelor salivare, la care, prin tradiție, sînt denumite *acini*. Unele glande cuprind un amestec de unități secretorii tubulare și alveolare și sînt denumite *glande tubuloalveolare* (fig. 4.9).

Un alt criteriu de clasificare a glandelor exocrine este natura produsului lor de secreție. Astfel, glandele *seroase* produc secreții apoase, care, în numeroase cazuri conțin enzime, iar *glandele mucoase* secretă mucus glicoproteic, vîscos. *Glandele mixte* produc ambele tipuri de secreție. Unitățile seroase, unitățile mucoase și unitățile mixte alcătuite din celule seroase și mucoase pot fi deosebite unele de altele pe secțiunile microscopice colorate cu hematoxilină-eozină.

Atunci cînd unitatea secretorie (acinul) este secționată transversal, celulele sale apar cu un contur triunghiular (fig. 4.10). În cazul *acinilor seroși*, baza mai largă a fiecărei celule secretorii este intens bazofilă datorită abundenței reticulului endoplasmic rugos. Celula prezintă un nucleu mare, rotund. În glandele secretorii de enzime, granulele de zimogen

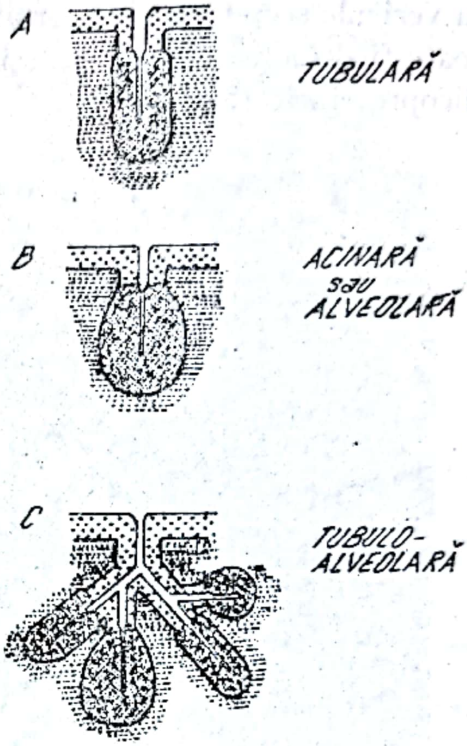


Fig. 4. 9. — Principalele tipuri de epitelii glandulare:
A — tubular simplu; *B* — alveolar; *C* — tulbuloalvolar.

Fig. 4. 10. — Acini seroși (pancreas, HE; X 700).

colorate în roşu ocupă porţiunea apicală a celulelor. Aceste granule reprezintă vezicule secretorii care conţin enzime şi precursorii lor.

În contrast cu colorarea puternică a acinilor seroşi, *acinii mucoşi* apar palid coloraţi. În celulele secretorii de mucus, nucleul este relativ mic, turtit, situat la baza celulei. Restul celulei este foarte palid, deoarece este umplut cu vezicule secretorii care conţin mucus. Conţinutul mucos al acestor vezicule poate fi demonstrat prin reacţia PAS *(Periodic Acid-Schiff)*, care colorează glicoproteinele (fig. 4.11).

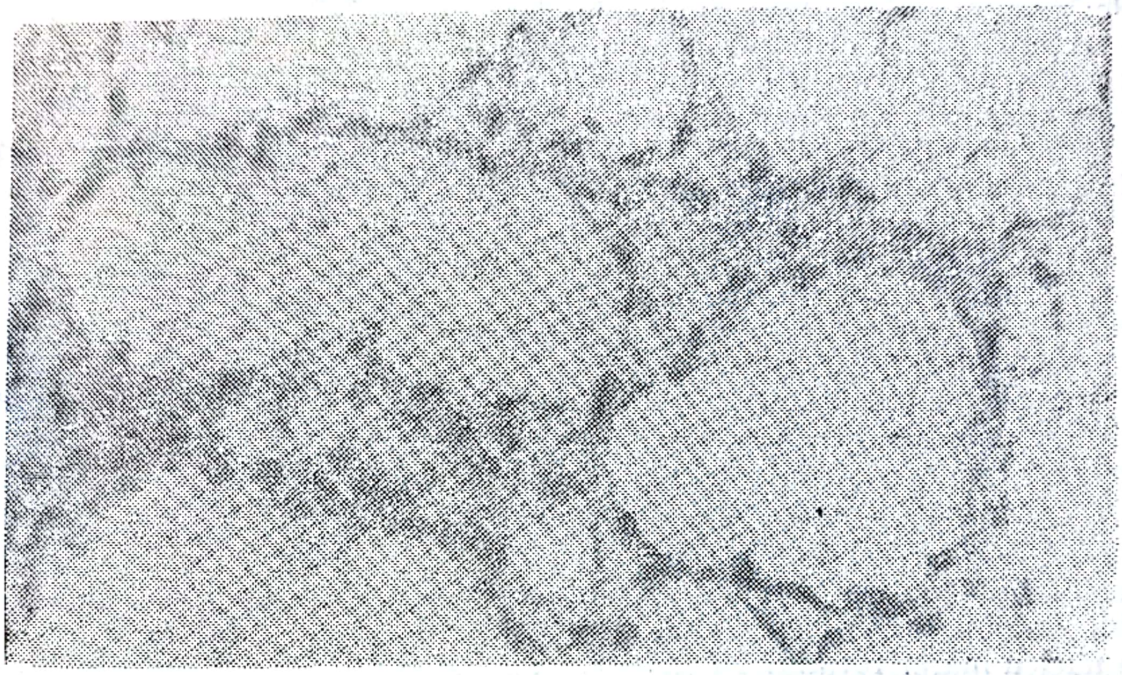


Fig. 4. 11. — Acini mucoşi (glandă sublinguală, HE; X 500).

4.2.2.1.2. Glandele mixte

Glandele mixte care produc seromucus sînt prevăzute atît cu acini seroşi cît şi mucoşi. Ele prezintă şi acini micşti, alcătuiţi din celule secretorii seroase şi celule secretorii mucoase, care îşi varsă produsul de secreţie în acelaşi lumen. Fiecare acin este compus în principal din celule secretoare de mucus, dar are şi o cupolă mică de celule secretorii seroase, situate pe o latură. Deoarece această cupolă seamănă în secţiune transversală cu o lună în creştere, ea a fost denumită *semiluna seroasă* (fig. 4.12).

Cînd cercetăm unităţile secretorii ale unei glande exocrine, putem observa celule epiteliale de un tip special, situate în jurul acinului, interpuse între celulele secretorii şi membrana bazală. Ele posedă lungi prelungiri care se dispun în jurul celulelor secretorii, purtînd denumirea de *celule în coşuleţ* (pentru studiul lor se folosesc metode speciale de colorare). Funcţia acestor

Scanned with OKEN Scanner

celule este aceea de a se contracta, pentru a ajuta la eliminarea produsului de secreție din unitățile secretorii în sistemul de canale. Deoarece aceste celule sînt contractile și au origine epitelială, mai sînt cunoscute și sub denumirea de *celule mioepiteliale*.

Fig. 4. 12. — Acini micști (glandă submandibulară, HE; × 500)

În sfîrșit, un alt criteriu de deosebire a glandelor exocrine este *mecanismul secreției*. Astfel, celulele secretorii ale unor *glande endocrine* (gr. *meros* = parte; *krinein* = a secreta) își elimină secreția prin exocitoză, adică prin fuziunea veziculelor secretorii cu membrana celulară, și de aceea sînt denumite merocrine. Cele mai multe glande exocrine sînt de acest tip și cel mai la îndemînă exemplu este pancreasul exocrin. Într-un alt tip de glande, cum sînt glandele sebacee, produsul de secreție se elimină în alt mod — în acest caz, întreaga celulă se elimină împreună cu secreția sa și glanda este denumită *holocrină* (gr.: *holos* = tot). De îndată ce celulele generate de stratul bazal se deplasează spre interior, ele acumulează lipide, devin palide și de aspect vacuolar. Ele se dezintegrează apoi și devin sebum, secreție care menține suplețea firului de păr. A treia categorie este formată din glandele *apocrine* (gr.: *apo* = din). În epoca microscopiei optice, s-a format părerea că unele celule glandulare (de exemplu așa-numitele glande sudoripare apocrine) pierd o parte din citoplasma apicală în cursul eliminării produsului lor de secreție. Studiile de microscopie electronică n-au confirmat această părere. Singura glandă care ar putea justifica această denumire este glanda mamară, care elimină o peliculă fină citoplasmatică, odată cu lipidele și cu porțiuni mici de membrană. Se pare deci că conceptul de secreție apocrină nu mai are decît o importanță istorică.

4.2.2.1.3. Arhitectura glandelor exocrine compuse

Toate glandele exocrine compuse (exemplu: pancreasul exocrin, glandele salivare mari) sînt organizate pe baza aceluiași plan. Elementele lor epiteliale (unitățile secretorii și canalele excretorii) alcătuiesc așa-numitul *pa-*

renchim, care este susținut de țesutul conjunctiv (în care se află vasele sanguine), constituind *stroma* sa. Fiecare glandă este înconjurată de un țesut conjunctiv dens, *capsula*, din care pornesc travee de țesut conjunctiv, *septurile*, care subdivid parenchimul în *lobi* și *lobuli*. Septul conține ramificațiile vaselor sanguine și o mare parte din ramificațiile canalelor excretorii. Septurile interlobare conțin canalele interlobare mari, septurile interlobulare conțin canalele interlobulare. În interiorul lobului se află canalele intralobulare. Grupul de unități secretorii (acini), drenate de același canal excretor intralobular, formează o unitate denumită *adenomer*. Țesutul conjunctiv pătrunde sub formă de lame fine în interiorul parenchimului lobular, pentru a se distribui în jurul fiecărei unități secretorii.

Glandele exocrine își elaborează produsul de secreție ca răspuns la impulsurile nervoase sau cînd sînt stimulate hormonal. Răspunsul secretor al glandelor exocrine este involuntar, deoarece ele se află sub controlul sistemului nervos vegetativ.

4.2.2.2. Glandele endocrine

Organizarea glandelor endocrine este mai simplă, deoarece neavînd canale de excreție, ele își eliberează produsul de secreție în spațiul extracelular și apoi în patul sanguin. În consecință, celulele secretorii vor fi grupate intim în jurul capilarelor sanguine și în acest scop se dispun de regulă sub formă de cordoane celulare. Ele nu prezintă o suprafață liberă ca celelalte epitelii. O capsulă conjunctivă le separă net de organele adiacente. Din capsulă pornesc travee conjunctive care constituie un suport pentru ramificațiile vaselor sanguine. De obicei capilarele sanguine sînt abundente și stabilesc contacte intime cu celulele epiteliale ale parenchimului glandular.

Produsele de secreție a glandelor endocrine sînt cunoscute sub denumirea de *hormoni* (gr.: *hormaein* = a stimula), deoarece au efecte stimulatorii sau inhibitorii asupra celulelor-țintă, la care ajung pe cale sanguină. În ultimul timp s-a dovedit că și alte celule (neincluse în categoria glandelor endocrine) sînt capabile să secrete hormoni — de exemplu, celulele nervoase. Mai mult, unele glande care eliberează substanțe folositoare în patul sanguin, fără ca acestea să fie hormoni, sînt considerate în mod curent glande endocrine. Cel mai bun exemplu în acest sens este ficatul, considerat glandă cu secreție internă deoarece eliberează glucoza în sînge și, în același timp, glandă exocrină, pentru că secretă bila în sistemul de canale biliare, pe calea cărora bila ajunge în intestin.

4.3. CARACTERELE GENERALE ALE ȚESUTURILOR EPITELIALE

Cu toate că țesuturile epiteliale se prezintă sub diferite aspecte morfologice, care variază după funcția lor și poziția ocupată în organism, ele posedă unele caracteristici generale comune.

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1. FORMA CELULELOR

Forma și dimensiunile celulelor epiteliale variază, mergînd de la înalte, columnare, trecînd prin cuboide, la celule scuamoase (lat. *squama* = solz) sau pavimentoase și incluzînd toate formele intermediare. Aspectul lor poliedric obișnuit (vezi fig. 4.1) se datorează juxtapunerii celulelor în straturi sau lame. Un fenomen asemănător poate fi observat, dacă un mare număr de baloane de cauciuc sînt presate într-un spațiu restrîns. Prin colorări histologice corespunzătoare se disting nucleii variind de la forma sferică la cea alungită sau eliptică. Forma nucleului corespunde, în genere, formei celulei. Astfel, celulele cuboidale au nuclei sferici, celulele scuamoase — nuclei turtiți, iar cele columnare — nuclei alungiți. Axul mare al nucleului este întotdeauna paralel cu axul mare al celulei. Deoarece la microscopul optic limitele dintre celule nu pot fi de regulă distinse, observarea formei nucleului are o mare importanță, fiind o indicație indirectă asupra formei celulei. Aceasta are importanță și pentru determinarea dispoziției celulelor — în straturi sau nu —, ceea ce servește drept criteriu primar pentru clasificarea epiteliilor.

4.3.2. POLARITATEA TISULARĂ

Toate țesuturile epiteliale prezintă polaritate, în sensul că li se poate distinge o suprafață externă, orientată fie către exteriorul corpului, fie către lumenul cavității organismului, și o suprafață internă, orientată spre mediul intern, adică spre țesutul conjunctiv care conține vase sanguine. Cu alte cuvinte, epiteliile sînt întotdeauna polarizate după axul care pornește de la mediul extern spre mediul intern. Fața internă a epiteliilor este întotdeauna așezată pe o structură extracelulară lamelară, denumită membrană bazală. Așadar, membranele bazale mediază relația dintre țesuturile epiteliale și țesutul conjunctiv subiacent. Suprafața externă a epiteliilor este reprezentată fie de straturi celulare foarte diferențiate, în cazul țesuturilor epiteliale stratificate, fie cu diferențieri speciale ale polului apical al celulelor, în cazul epiteliilor monostratificate și al epiteliilor glandulare. Întrucît țesuturile epiteliale nu sînt vascularizate, vasele sanguine rămînînd în țesutul conjunctiv subiacent, substanțele trofice din patul sanguin trebuie să străbată membrana bazală ca să ajungă la celulele epiteliale. Aceasta face ca straturile bazale ale epiteliilor să se hrănească mai ușor și să fie mai active biologic, în vreme ce straturile superficiale sînt mai puțin active și pe cale de eliminare.

Există unele specializări ale suprafeței țesuturilor epiteliale, de a căror semnificație funcțională ne vom ocupa în subcapitolul 4.6. Specializările suprafeței unor epitelii simple le vom lua în considerație în cadrul paragrafului 4.4.3. — polaritatea celulelor epiteliale. În cazul epiteliilor simple, noțiunea de polaritate tisulară se suprapune peste cea de polaritate celulară.

4.3.3. CELULARITATEA

Epiteliile sînt alcătuite virtual numai din celule. Ele se prezintă ca mase compacte de celule, între care nu există spații intercelulare observabile la microscopul optic și nici vase sanguine. Celularitatea epiteliilor contrastează frapant cu țesutul conjunctiv adiacent, care se caracterizează tocmai

Scanned with OKEN Scanner

prin celule dispersate, separate între ele de largi spații cu fluid intercelular și fibre. Totuși, suprafețele celulelor epiteliale delimitează un spațiu intercelular foarte îngust, de cca 35 nm, dimensiune accesibilă numai microscopului electronic. În acest spațiu se află matricea extracelulară, în cantitate redusă. Datorită epiteliilor, corpul omenesc este despărțit de mediul ambiant printr-un strat continuu de celule, astfel încît nimic nu poate pătrunde și nici nu poate ieși din organism fără să fie supus sistemului de control al celulelor vii.

Celularitatea țesuturilor epiteliale are la bază capacitatea de adezivitate a celulelor ce compun țesutul respectiv.

După cum s-a menționat în capitolul 3, adezivitatea este o proprietate generală a suprafeței tuturor celulelor și se manifestă fie *in vivo*, fie *in vitro*. *In vivo*, celulele epiteliale prezintă: *a)* adezivitate *simplă*, fie față de matricea extracelulară sau de membranele bazale, fie față de alte celule prin intermediul suprafețelelor celulare adiacente (separate de spațiul intercelular) și *b)* adezivitate *prin joncțiuni speciale*, între celule sau între celule și membrana bazală.

Fiecare tip de adezivitate este mediat de familii diferite de molecule. Fiecare sistem supramolecular de acest fel conține molecule codificate de gene diferite, dar anumite molecule din sisteme diferite interacționează pentru a-și modula reciproc funcțiile.

Adezivitatea celulară este un fenomen complex, cu profunde implicații biologice. Atașarea și comunicarea celulelor sînt implicate în dezvoltarea, diferențierea și organizarea țesuturilor, în migrarea celulară, în vindecarea rănilor, în inflamație, în proliferarea malignă și formarea metastazelor.

În dispozitivele joncționale speciale, moleculele care mediază adezivitatea intercelulară (sau cu membrana bazală) sînt subordonate unor ultrastructuri caracteristice, care dau o configurație stabilă locului de joncțiune. Ele conferă polaritate celulelor și țesuturilor.

În țesutul epitelial *adezivitatea simplă* este reprezentată de joncțiunile intercelulare simple — spațiile intercelulare cu o dimensiune medie de 30—35 nm. Traiectul membranelor adiacente este fie *rectiliniu*, fie *denticulat*, fie *digitiform*. Spațiul intercelular este ocupat de o *matrice extracelulară*, redusă cantitativ, care constă dintr-o trămă de complexe moleculare glicoproteice, care formează ochiuri largi, ancorate prin intermediul glicocalixului de glicoproteinele integrale ale membranelor celulare alăturate. În ochiurile acestei trame proteice, *lichidul intercelular* (alcătuit din apă, săruri și molecule organice diferite) circulă liber, fiind un mediator al schimburilor metabolice între celulele epiteliale și țesutul conjunctiv subiacent, în care se află vasele sanguine.

La nivelul joncțiunilor simple, celulele interacționează pe de o parte, prin intermediul matricei extracelulare și pe de alta, direct, pe calea moleculelor care intră în alcătuirea suprafețelor celulare.

În toate tipurile de țesuturi, adezivitatea la matrice (ca și cea la membranele bazale) este mediată de sistemul de molecule matriceale ca fibronectina, laminina și colagenul, cărora le corespund receptori ai suprafeței celulare, reprezentați de sialoglicoproteine integrale ale membranei (fig. 4.13).

Adezivitatea directă între suprafețele celulelor este mediată de un sistem de sialoglicoproteine integrale ale membranelor celulare adiacente, care au locuri de interacțiune complementare.

Scanned with OKEN Scanner

Vom analiza pe rînd, componentele țesuturilor epiteliale implicate în adezivitate.

Matricea extracelulară epitelială este alcătuită din *molecule de colagen, glicoproteine, proteoglicani și glicozil-transferazele interstițiale.*

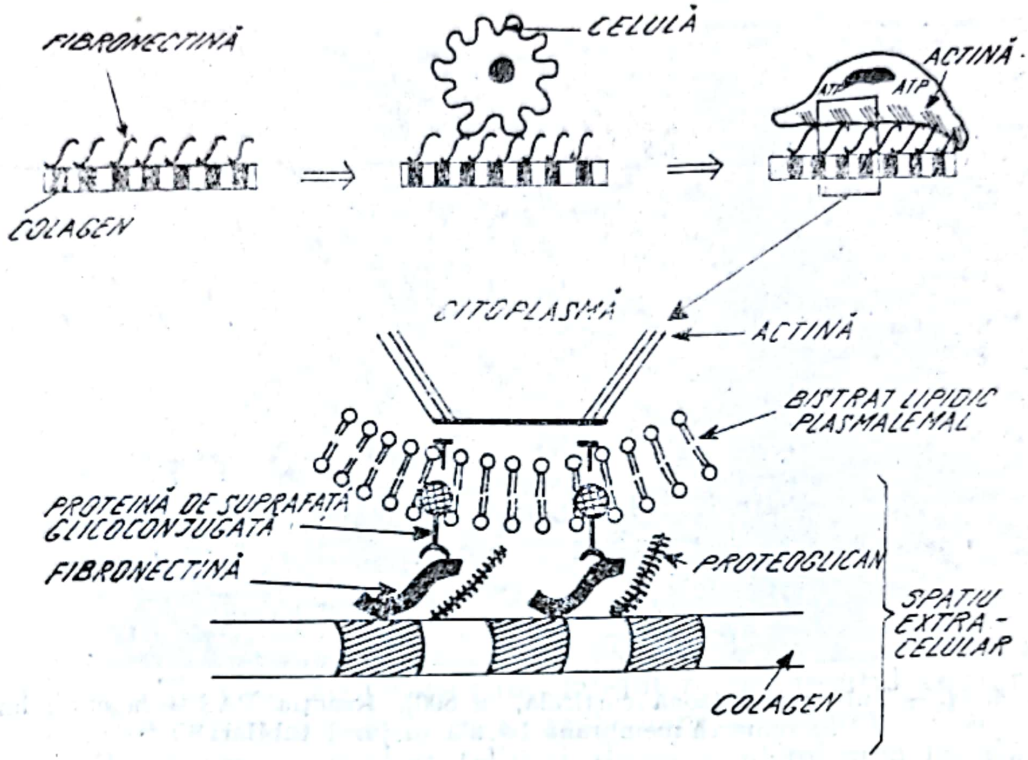


Fig. 4. 13. —
A — Adezivitatea suprafeței celulare la colagenul interstițial este mediată de fibronectină și de proteoglicani; *B* — detaliu mărit din *A*.

Celulele epiteliale sintetizează și eliberează în matricea extracelulară mici cantități de colagen de tip IV, V și VI. Colagenul de tip IV și V se găsește în cantități mai mari în membranele bazale. Colagenul de tip VI este monomeric, are o greutate moleculară de 120 000 daltoni, iar moleculele sale polipeptidice fiind legate prin punți disulfidice, nu se organizează în agregate supramoleculare complexe, ci se distribuie în matrice sub formă de molecule dispersate.

4.3.4. MEMBRANA BAZALĂ

Toate țesuturile epiteliale prezintă pe suprafața lor bazală, în contact cu țesutul conjunctiv subiacent, o structură lamelară, fină, a matricei extracelulare, denumită *membrana bazală.*

Termenul de membrană bazală a fost atribuit, în histologia clasică, structurilor observabile la *microscopul optic*, alcătuite dintr-o lamă fină polizaharidică, care cimentează baza epiteliilor și care se asociază cu o tramă reticulară fină pe frontul conjunctiv. Lama polizaharidică a fost individualizată selectiv prin reacția PAS sau prin impregnații cu săruri de argint (fig. 4.14 și 4.15) Prin metoda PAS * se colorează în roșu-purpuriu, cu reactivul

* Metoda PAS = metoda *Periodic Acid-Schiff.*

Scanned with OKEN Scanner

Schiff, majoritatea polizaharidelor care formează grupări aldehidice libere, după oxidarea prealabilă cu acid periodic. În figura 4.14 este ilustrat aspectul membranei bazale la microscopul optic, cu reacția PAS. Majoritatea epiteliilor prezintă membrane bazale de formă lamelară, a căror grosime este de

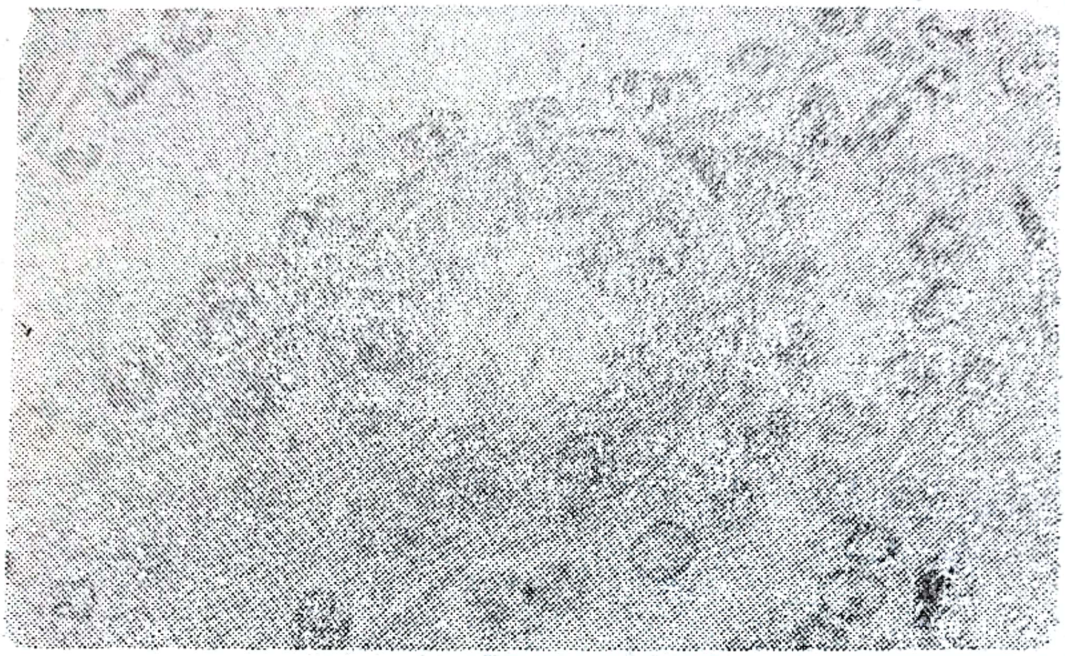


Fig. 4. 14. — Tubi renali (zonă corticală, × 800). Reacția PAS + hematoxilină. Se remarcă membrana bazală în jurul tubilor.

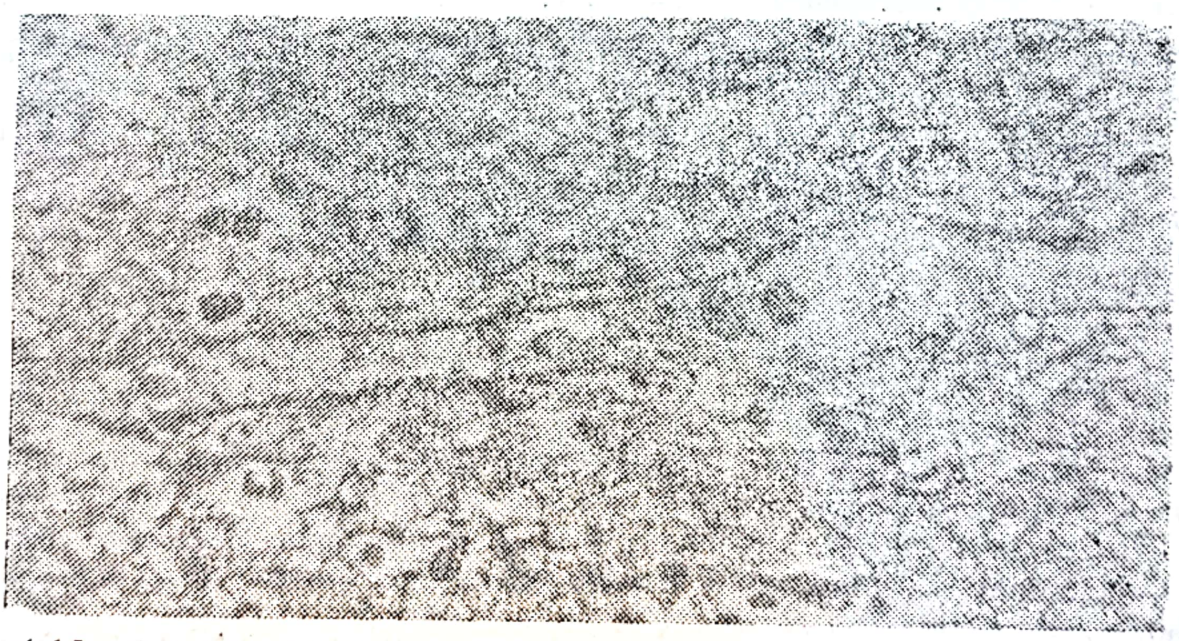


Fig. 4. 15. — Splină (× 500). Reacția Willander pentru fibrele de reticulină + hematoxilină. Se remarcă membrana bazală din peretele sinusurilor splenice care este impregnată discontinuu cu săruri de argint.

ordinul zecimilor de microni, deci aproape de limita puterii de rezoluție a microscopului optic, utilizat curent în laboratoare. Așa este cazul membranei bazale din epiderm, epiteliul respirator, glandele exocrine etc. Membrane bazale groase de cîțiva microni întîlnim la nivelul epiteliilor anterior și pos-

Scanned with OKEN Scanner

terior ale corneei (fig. 4.16), precum și în epiteliul cristalinian. Pe de altă parte, existența membranei bazale în epiteliul vezicii urinare a fost multă vreme pusă la îndoială în histologia clasică, deoarece grosimea ei este sub puterea de rezoluție a microscopului optic. Membranele bazale separă de obicei

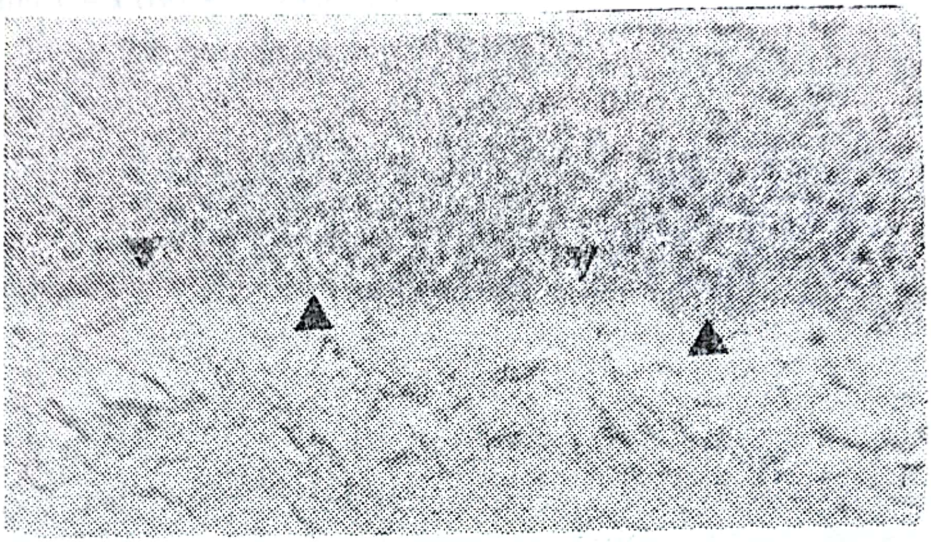


Fig. 4.16. — Membrană bazală (▲) (cornee, HE, × 400).

țesuturile epiteliale de acoperire sau glandulare de țesutul conjunctiv subiacent. În alte cazuri, așa cum este cazul glomerulului renal (foița viscerală a capsulei Bowmann), sau al epiteliului alveolar, membrana bazală este singura structură care se interpune între epiteliul respectiv și endoteliul capilarelor sanguine, avînd funcția de filtru foarte selectiv. În ultimul timp se acumulează dovezi din ce în ce mai numeroase că membranele bazale sînt mai mult decît suport structural și filtru. Ele par să fie capabile de a induce diferențirea, de a influența metabolismul celular, de a induce organizarea proteinelor din membrana plasmatică adiacentă și de a constitui o cale specifică pentru migrarea celulelor. Pentru aprofundarea funcțiilor sale complexe este necesară elucidarea organizării ultrastructurale și moleculare a membranei bazale.

La microscopul electronic membrana bazală apare ca o structură matriceală fină, prezentă în toate tipurile de țesuturi epiteliale, pe fața lor internă, separîndu-le de țesutul conjunctiv subiacent (fig. 4.17). Pe imaginile electronomicroscopice de rutină, membranele bazale apar alcătuite dintr-un strat granular fin în care este cuprinsă o țesătură delicată de fibrile foarte fine. În mod obișnuit, la microscopul electronic pot fi distinse *trei* straturi lamelare suprapuse în grosimea membranelor bazale. Principalele două sînt: *lamina lucida* (denumită și *lamina rara)* adiacentă celulelor epiteliale, în grosime de 10 nm, care în preparatele de rutină apare omogenă și traversată de rare filamente fine; *lamina densa* * (denumită și *basal lamina)* în grosime de 20—

* În mod frecvent, în cărțile de histologie, ca și în alte lucrări de specialitate, conceptul de membrană bazală este restrîns la *lamina densa*, adică la stratul intermediar al membranei bazale, prezentat de noi mai sus. Confuzia provine în parte și din faptul că membrana bazală mai este denumită în limba engleză și *basal lamina*. Acest ultim termen este confuz și trebuie evitat. Termenul englezesc corect este *basement membrane*.

Scanned with OKEN Scanner

30 nm, care în imaginile obișnuite apare constituită din filamente fine, abundente, incluse într-o matrice amorfă densă. Cea de a treia lamă, mai puțin clar definită ca strat, este *lamina (pars) fibroreticularis*, care marchează tranziția la matricea țesutului conjunctiv (fig. 4.18 și 4.19). De asemenea, pe frontul plasmatic, membranele plasmatice ale celulelor epiteliale prezintă dispozitive joncționale de adezivitate speciale, denumite hemidesmozomi.

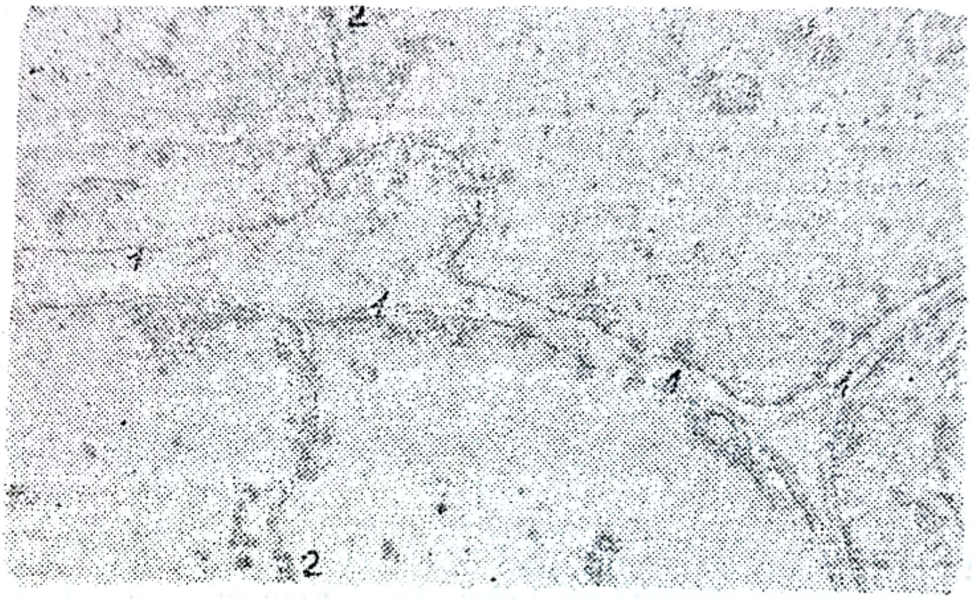


Fig. 4. 17. — Celulele endoteliale (electronomicrografie × 7 200): *1* — membrană bazală; *2* — desmozomi.

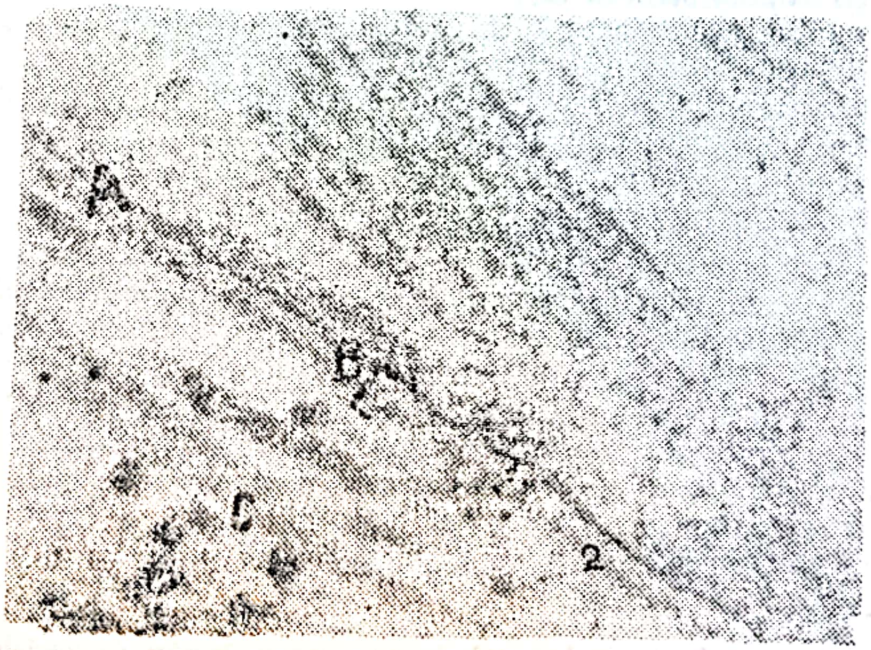


Fig. 4. 18. — Membrană bazală (electronomicrografie × 16 000): *A* — membrana plasmatică; *B* — membrana bazală: *1* — *lamina rara*; *2* — *lamina densa*; *C* — colagen.

Scanned with OKEN Scanner

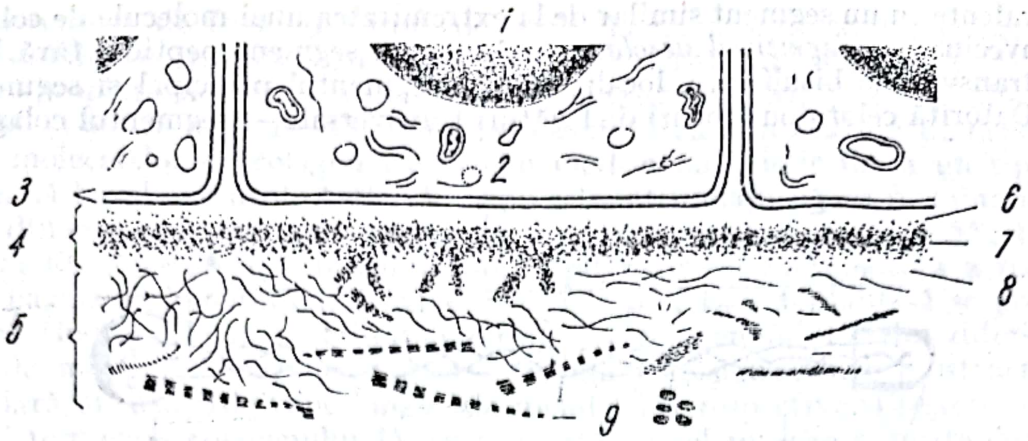


Fig. 4. 19. — Schema membranei bazale:
1 — nucleu; *2* — citoplasmă; *3* — plasmalemă; *4* — membrană bazală; *5* — fibre conjunctive; *6* — *lamina lucida: 7* — *lamina densa: 8* — *lamina reticularis: 9* — colagen.

4.3.4.1. Moleculele organice din structura membranei bazale

În membranele bazale au fost identificate mai multe tipuri de *molecule organice*, printre care: colagenul IV și V, proteoglicanul heparan sulfat, componentul amiloid P, antigenul „pemfigoid bulos", laminina și fibronectina.

Deși proporția acestora variază de la un tip de țesut la altul și chiar de la o regiune la alta în aceeași lamină, componentul major al tuturor membranelor bazale este *colagenul IV*, localizat în *lamina densa* (excepție — membrana bazală corneană normală).

4.3.4.1.1. Colagenul de tip IV

Colagenul de tip IV este un membru special al familiei de proteine colagenice. Spre deosebire de colagenul țesutului conjunctiv interstițial, care prezintă, la microscopul electronic, o organizare striată transversal, colagenul de tip IV are o moleculă mai mare și mai puțin prelucrată și de aceea membranele bazale apar mai curînd amorfe pe imaginile electronomicroscopice.

Studiile de biochimie, imunologie și electronomicroscopie întreprinse recent dovedesc că moleculele de colagen IV din membranele bazale prezintă patru segmente diferite (fig. 4.20). *Segmentul principal* este reprezentat de un șnur, în lungime de cca 30 nm, compus din trei polipeptide dispuse spiralat. Acesta este pus în evidență ușor prin digestia cu proteaze, care distrug celelelte segmente ale moleculei, dar nu și segmentul principal, rezistent la aceste enzime. El este însă digerat complet de colagenazele bacteriene. Un al doilea segment, triplu spiral, este denumit *segmentul 7 S*, are lungimea de 60 nm și este plasat la una din extremitățile segmentului principal. În membrana bazală, extremitatea cea mai externă a segmentului 7 S, în lungime de 30 nm, interacționează covalent cu alte trei segmente similare, aparținînd altor trei molecule de colagen IV învecinate. Molecula de colagen IV mai cuprinde și *două segmente necolagenice*. *Fragmentul necolagenic 1* se prezintă morfologic ca un domeniu globular, este plasat la extremitatea opusă segmentului 7 S, are legături bisulfidice și este capabil să formeze legături

Scanned with OKEN Scanner

necovalente cu un segment similar de la extremitatea unei molecule de colagen IV învecinate. *Fragmentul necolagenic 2* este un segment peptidic fără legături transversale bisulfidice, localizat între segmentul principal și segmentul 7 S. Datorită celor două locuri de legături transversale — segmentul colagenic

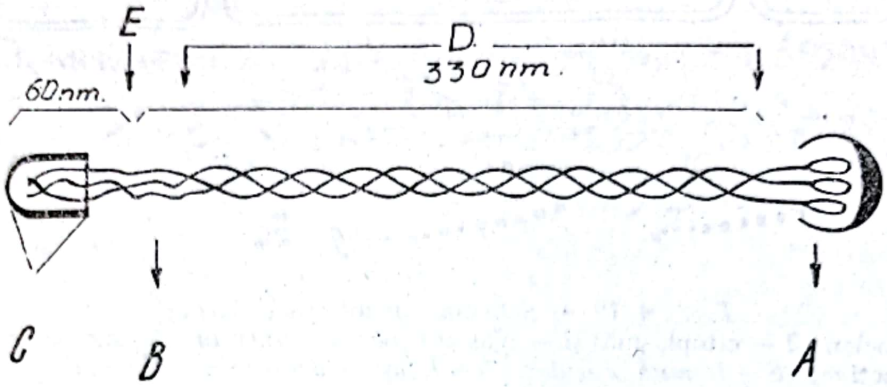


Fig. 4.20. — Schema moleculei de colagen IV: *A* — domeniu necolagenic *1* (globulos); *B* — domeniu necolagenic 2; *C* — fragment 7S; *D* — segment major; *E* — zona mobilă a moleculei.

7 S și fragmentul necolagenic 1 — moleculele de colagen tip IV organizează o rețea moleculară în „pînză de păianjen" (fig. 4.21). În acest fel fragmentele 7 S stabilesc legături covalente între patru molecule de colagen, iar fragmentele globulare necolagenice constituie cel de al doilea loc de interacțiune, necovalent, între două molecule de colagen IV.

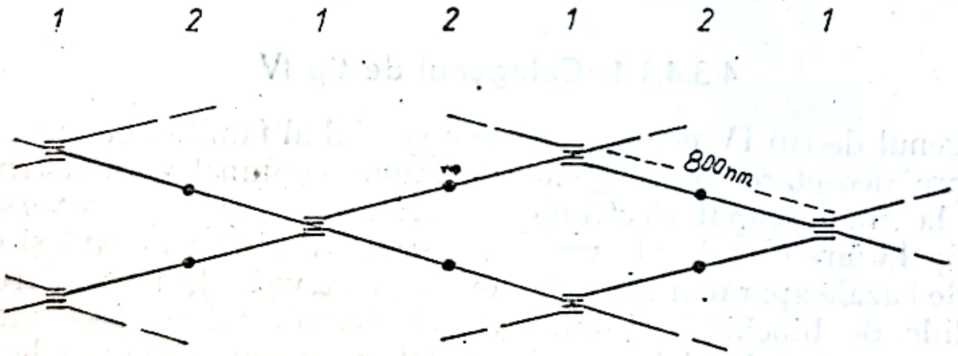


Fig. 4.21. — Modelul bidimensional al asocierii moleculelor de colagen IV.

Aranjarea moleculelor de colagen IV într-o rețea ne permite să înțelegem de ce membranele bazale sînt prevăzute cu o considerabilă stabilitate mecanică și, în același timp, cu o remarcabilă flexibilitate. În condiții fiziologice, se cere schimbarea rapidă a suprafeței totale a membranei bazale, ca, de exemplu, în contracția și dilatarea vaselor sanguine. Relaxarea pînzei este ușurată de diferențele de flexibilitate a diferitelor segmente ale moleculei de colagen, precum și de multiplicarea răsucirilor și nodurilor. Stabilitatea mecanică este controlată de legăturile covalente și de cele necovalente, realizate pe extremitățile 7 S și, respectiv, extremitatea globuloasă a moleculelor de colagen IV.

Scanned with OKEN Scanner

Structura de bază, în formă de triplu helix, a segmentului principal, are o stabilitate termică (sau temperatura de denaturare a triplului helix) relativ apropiată de temperatura corpului uman: între 37° și 40° *in vitro* și între 50° și 60° *in vivo*. De asemenea, se constată că temperatura de denaturare a moleculelor de colagen variază în mod caracteristic de la un tip de membrană bazală la altul. Astfel, în timp ce pentru majoritatea membranelor bazale din corpul uman, stabilitatea termică fluctuează între 50° și 55°, temperatura de denaturare a membranelor capilarelor sanguine și cea a membranei bazale a glomerulului renal se ridică la 60°. Este tentant să se presupună că fluctuațiile în stabilitatea termică a colagenului IV din diferitele tipuri de membrane bazale reflectă diferența corespunzătoare în structura moleculară și însușirile funcționale ale membranei respective. Creșterea stabilității termice a colagenului IV *in vivo* față de cel *in vitro* se poate datora faptului că în membranele bazale naturale colagenul se află complexat cu alte tipuri de proteine.

4.3.4.1.2. Proteoglicanul heparan – suflat

Proteoglicanul heparan-sulfat este prezent în diferite tipuri de membrane bazale și poate fi localizat fie pe o față și pe alta a *laminei densa*, fie în *lamina lucida*.

4.3.4.1.3. Glicoproteine

Antigenul „pemfigoid bulos", sau proteina similară antigenului pemfigoid bulos, este o glicoproteină cu legături bisulfidice intramoleculare și cu greutatea moleculară de 220 000 daltoni, identificată în *lamina lucida* a membranelor bazale normale. Această glicoproteină, prezentă în mod normal în membranele bazale, își datorează denumirea faptului că a fost descoperită la pacienții care suferă de o boală autoimună a pielii, pemfigoidul bulos, caracterizată prin apariția de autoanticorpi împotriva acestei proteine constitutive a membranei bazale, care astfel devine antigen. Mecanismul de producere a autoanticorpilor nu este cunoscut, deoarece proteina nu este inițial alterată.

Amiloidul P este o glicoproteină care a fost identificată, prin imunofluorescență, în numeroase tipuri de membrane bazale.

Laminina, component major al membranelor bazale, ca și colagenul IV, este o glicoproteină mare, compusă din două subunități — una de 220 000 și alta de 440 000 daltoni — , care conțin legături disulfidice.

Fibronectina este o glicoproteină (cu 5% din greutate carbohidrați) care formează fibre, compusă din două subunități de cîte 220 000 daltoni fiecare, legate prin punți disulfidice. Cea mai mare parte din fibronectină este distribuită sub formă de agregate macromoleculare în matricea extracelulară, o parte există în membranele bazale (cu o excepție: membrana bazală corneană normală), iar o fracțiune din fibronectina tisulară se află legată de suprafața celulelor. Există o corelație semnificativă între scăderea cantității de fibronectină legată de suprafața celulară și scăderea adezivității, care reprezintă o caracteristică a celulelor transformate malign, cu mare putere de metastazare.

Scanned with OKEN Scanner

4.3.4.2. Bazele moleculare ale ultrastructurii

Recent s-au făcut progrese importante în clarificarea *felului în care componentele moleculare majore sînt asociate în edificarea ultrastructurilor* care intră în alcătuirea membranelor bazale. Astfel, s-au putut identifica trei tipuri de formațiuni ultrastructurale în membranele bazale:

a) cordoane groase de 3—8 nm (în medie 5 nm) aranjate într-o țesătură tridimensională — această țesătură este laxă în *lamina lucida* și densă în *lamina densa;* cordoanele sînt alcătuite dintr-o teacă de laminină și un miez filamentos de colagen IV (fig. 4.22);

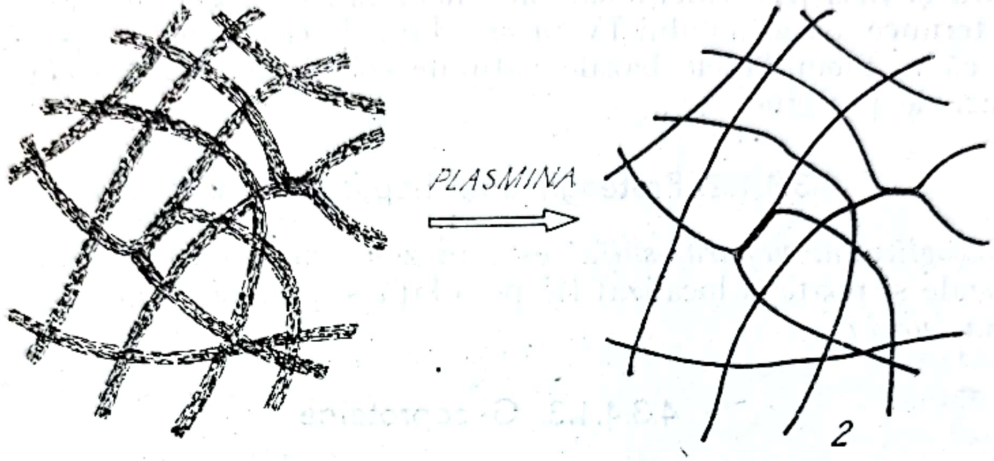


Fig. 4, 22. — Schema efectului plasminei asupra rețelei de corzi din membrana bazală.
1 — rețea de corzi; *2* — rețea de filamente.

b) tubuli rectilinii, denumiți bazotubuli, cu diametre de 7—10 nm, distribuiți lax printre cordoane, fără să se ramifice, orientați paralel cu suprafața și de aspect rigid. Compoziția bazotubulilor nu este complet elucidată. În orice caz, în alcătuirea lor intră și amiloidul P. Bazotubulii sînt alcătuiți din două părți: tubulul propriu-zis și un înveliș gros de 1 nm, dispus în formă de bandaj în jurul miezului tubular. După fixare cu permanganat, bazotubulii apar înconjurați de o „pîslă" fină, care nu se conservă la fixarea cu glutaraldehidă;

c) formațiuni în formă de „picături", cu diametrul de 3,5 nm denumite *cîrlige duble,* sînt prezente între ochiurile rețelei de cordoane. Semnificația și compoziția acestor formațiuni rămîn să fie elucidate (fig. 4.23).

Prin metode imunohistochimice, s-a stabilit că membranele bazale conțin nu numai colagen IV, laminină și amiloid P, ci și heparan sulfat, precum și mai multe glicoproteine ca fibronectina, entactina și altele. Pînă în prezent nu s-a stabilit felul în care aceste proteine participă la edificarea ultrastructurilor din membranele bazale și nu se poate preciza încă mecanismul prin care participă fiecare tip de moleculă organică la procesele biologice în care este implicată membrana bazală.

Cercetări recente indică trei tipuri de molecule, și anume colagenul IV, antigenul pemfigoid bulos și laminina, ca prezentînd o importanță specială pentru stabilitatea epiteliilor pluristratificate, în mod special a epidermului.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste trei componente structurale au o importanță deosebită, cel puțin în stabilitatea interacțiunii celulelor epiteliale cu membrana bazală. Laminina efectuează atașarea celulelor epiteliale de colagenul IV, atît *in vitro*, cît și

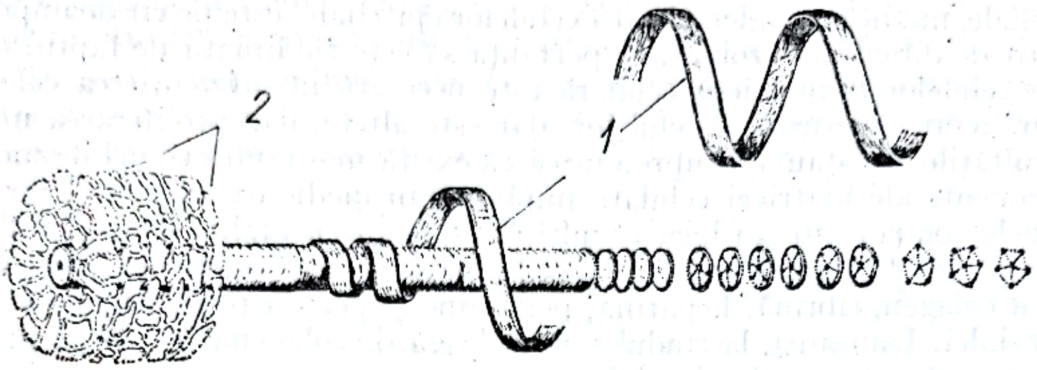


Fig. 4.23. — Schema organizării bazotubulului:
1 — înveliș dispus helicoidal; *2* — înveliș peritubular cu aspect de pîslă.

in vivo. Rolul antigenului pemfigoid bulos este demonstrat de faptul că pacienții cu pemfigoid bulos prezintă detașări ample ale celulelor epiteliale de pe *lamina densa* a membranei bazale. Pemfigoidul bulos constituie, în acest sens, un „experiment natural". Formarea de complexe autoimune antigen-anticorp duce la dispariția adezivității între celulele stratului bazal al epidermului și *lamina densa* a membranei bazale. Pe de altă parte, autoanticorpii activează fracțiunile C' 5-6-7 ale complementului, ceea ce declanșează un proces inflamator cu participarea leucocitelor polimorfonucleare, care sînt atrase prin chimiotactism la locul de reacție antigen-anticorp, se degranulează și eliberează enzime lizozomale care contribuie la procesul inflamator, acesta extinzîndu-se în toate straturile epidermului.

Dovezi experimentale recente arată că prezența componentelor membranei bazale, antigenul „pemfigoid bulos", laminina, colagenul IV, nu este esențială în inițierea procesului de vindecare a rănilor (de altfel membrana bazală sau unele componente ale ei sînt îndepărtate mecanic prin rănire). În acest caz special, proteine matriceale ca fibronectina, fibrinogenul/fibrina se depun pe suprafața rănii, servind drept suport pentru migrarea celulelor care vor regenera epiteliul. Cînd migrarea celulelor epiteliale s-a încheiat, reapar componentele normale ale membranei bazale — laminina, antigenul „pemfigoid bulos", colagenul IV.

4.4. CELULELE EPITELIALE

4.4.1. SUPRAFAȚA CELULARĂ

În capitolul 3 s-a arătat că glicoproteinele matricei intercelulare (de tipul fibronectinei sau lamininei) prezintă un segment foarte mic care mediază etalarea lor pe un suport matriceal.

Pe de altă parte (v. fig. 4.13), glicoproteinele se leagă printr-un alt pol de receptorii de suprafață, reprezentați de segmentele glucidice ale proteinelor

Scanned with OKEN Scanner

integrale din membrana plasmatică a celulelor epiteliale. Receptorii de suprafață sînt saturabili, iar glicoproteinele matriceale pot acționa și ca inhibitori competitivi ai adezivității.

Identificarea naturii chimice a receptorului de la suprafața celulelor epiteliale, implicat în adezivitatea celulelor epiteliale, este pe cît de importantă pe atît de dificil de rezolvat. Importanța sa este subliniată de faptul că aderarea celulelor la matricea celulară este necesară în diferențierea celulară și în proliferarea normală a celulelor, dar este alterată în proliferarea malignă. Dificultățile constau în împrejurarea că există mai multe tipuri de molecule, componente ale matricei celulare, implicate în medierea adeziunii, iar faptul că unele componente au locuri multiple de legare complică și mai mult soluționarea problemei. De exemplu, fibronectina are locuri de legare diferite pentru colagen, fibrină, heparină, poliamine și pentru receptorii de la suprafața celulei. Laminina, la rîndul său, se leagă de colagenul IV, heparan sulfat și de receptorul suprafeței celulare.

Pînă de curînd, singurul receptor celular de suprafață izolat, era cel pentru laminina matricei intercelulare. Cercetările recente au dovedit că oligozaharidele legate de asparagină, de la periferia proteinelor integrale plasmalemale, sînt implicate în diferite tipuri de adezivitate celulară, datorită capacității acestora de a se lega de laminina din matricea intercelulară. Deoarece laminina apare în primele stadii ale embriogenezei, prezența oligozaharidelor care conțin poli-N-acetil lactozamina, legate de asparagină, poate fi implicată în detașarea și deplasarea celulelor în cursul embriogenezei. Modularea adezivității prin modificarea structurii oligozaharidelor a fost observată în histogeneză. Astfel, detașarea acidului sialic de pe oligozaharidele celulelor progenitoare ale retinei, este însoțită de creșterea adezivității celulelor respective, care are drept consecință diferențierea celulelor din forma embrionară în forma adultă.

Receptorul membranei celulare pentru laminină prezintă o importanță specială în cazul unor fenotipuri de celule canceroase. S-a sugerat că o creștere a sialilării și a mărimii oligozaharidelor legate de asparagină ale unor proteine integrale din membrana plasmatică a celulelor malignizate ar putea fi incriminată în scăderea adezivității celulelor tumorale, iar aceasta ar avea drept consecință creșterea capacității de metastazare. O sușă a celulelor tumorale este cu atît mai puternic metastazantă, cu cît complexul oligozaharidic atașat de asparagină este mai complet sialilat. Mutantele mai puțin sialilate se dovedesc a fi mai puțin metastazante, mai sensibile la celulele *killer* și mai adezive la laminină, fibronectină și colagen IV decît formele de tumori originare. Astfel, atît sensibilitatea la celulele *killer*, cît și adezivitatea celulară par să fie în legătură cu complexul oligozaharidic incomplet de la suprafața celulei tumorale.

În concluzie, se poate presupune că sialilarea completă a complexului oligozaharidic legat de asparagină maschează sau suprimă recunoașterea structurii glicoproteinelor din matricea extracelulară și, în consecință, scade adezivitatea și „recunoașterea" intercelulară.

În afară de receptorii pentru moleculele matricei, suprafața celulară mai posedă sialoglicoproteine transmembranare care mediază adezivitatea

Scanned with OKEN Scanner

directă *celulă-celulă*, prin interacțiunea unor segmente complementare din molecule aflate pe celule diferite. Dintre ele, au fost identificate relativ puține familii de molecule, mai ales cele ale suprafeței celulare a hepatocitelor, la diferite specii animale. Există o categorie de asemenea molecule care au specificitate pentru un anumit tip de celulă sau țesut și altă categorie, comună tuturor țesuturilor, care intervin în adeziunea nespecifică dintre celule.

Modularea acestor molecule de suprafață are loc, de asemenea, prin variația numărului radicalilor de acid sialic din moleculă, scăderea acestora fiind asociată cu o mai mare capacitate de adezivitate.

4.4.2. DISPOZITIVE JONCȚIONALE INTERCELULARE SPECIALE

Cu toate că celulele țesuturilor epiteliale sînt supuse unor mari variații de structură și arhitectură, ele sînt strîns atașate una de alta. Acest fapt poate fi observat și la microscopul optic. Atunci cînd diferite țesuturi epiteliale sînt studiate la microscopul electronic, se constată existența a numeroase dispozitive speciale de legătură intercelulară, care permit ca celulele epiteliale să fie menținute strîns atașate. Prezența și numărul acestor dispozitive joncționale speciale reflectă gradul solicitării mecanice, la care un anumit epiteliu este supus. Țesuturile epiteliale sînt supuse unui proces de reînnoire permanentă. Aceasta implică o regenerare celulară sincronă care, la rîndul său, necesită comunicații între celulele alăturate, în scopul reglării diviziunilor și diferențierii celulelor progenitoare și conservării celulelor precursoare. În epiteliile simple, ca de exemplu în epiteliul intestinal, trebuie ca spațiile intercelulare să fie complet închise, pentru a împiedica pierderea de fluid interstițial din țesutul conjunctiv subiacent, precum și pentru a evita pătrunderea în organism a unor bacterii din lumenul intestinal. În condițiile regenerării epiteliale normale, joncțiunile intercelulare speciale iau naștere și evoluează odată cu celulele epiteliului respectiv. Această evoluție începe cu formarea dispozitivelor speciale joncționale, în stratul bazal al epiteliilor pluristratificate, sau pe laturile celulelor din epiteliile simple, și se sfîrșește prin degenerarea joncțiunilor odată cu exfolierea celulelor îmbătrînite. Dispozitivele joncționale speciale sînt, de regulă, prea mici ca să poată fi observate la microscopul optic. Ele devin însă foarte ușor de studiat la microscopul electronic de transmisie, pe secțiuni ultrafine, sau la microscopul electronic de baleiaj. Aceste dispozitive joncționale speciale sînt în mod tradițional împărțite în trei categorii funcționale: *dispozitive joncționale de adezivitate*, care asigură aderarea mecanică a celulelor; *dispozitive joncționale impermeabile*, care nu numai că leagă celulele între ele, dar asigură și etanșeitatea epiteliilor, în așa fel încît moleculele nu pot trece prin spațiul intercelular; *dispozitive joncționale de comunicație*, care mediază trecerea unor molecule mici de la o celulă la alta. Diferitele tipuri de dispozitive joncționale sînt prezentate în tabelul 4. III și în fig. 4.24.

Trebuie menționat faptul că numeroase alte populații celulare din corp pot prezenta unul sau altul dintre dispozitivele joncționale menționate, dar ele constituie structuri care aparțin prin excelență epiteliilor.

Scanned with OKEN Scanner

4.4.2.1. Dispozitive joncționale de adezivitate

4.4.2.1.1. Desmozomii

Desmozomii, larg răspîndiți în țesuturi, *„ancorează" celulele împreună*; prin intermediul lor un grup de celule devin capabile să funcționeze ca o unitate structurală. Ei sînt mai abundenți în țesuturile supuse la solicitări mecanice severe, cum este cazul epidermului sau al epiteliului colului uterin, sugerînd prin aceasta că au mare importanță în realizarea solidarității celulare. Se prezintă în trei forme diferite: desmozomi în centură *(zonula adherens)*, desmozomi în spot *(macula adherens)* și hemidesmozomi — toate trei formele fiind prezente în majoritatea epiteliilor.

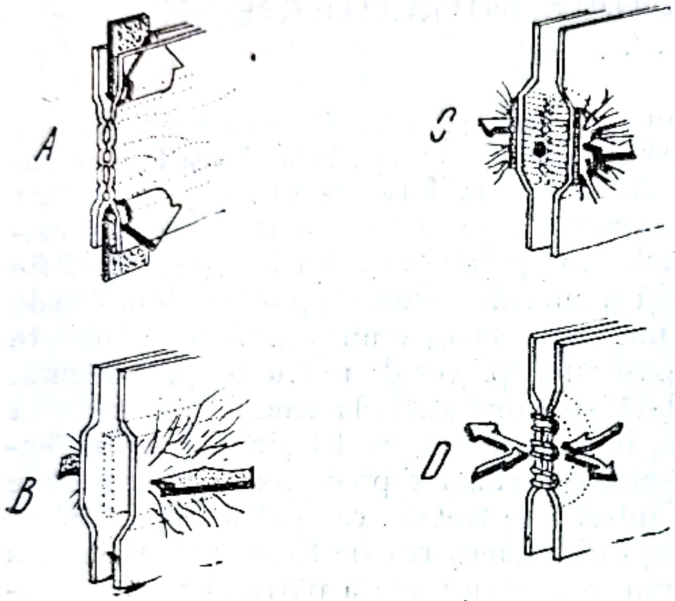


Fig. 4.24. — Cele patru tipuri de joncțiuni prezente în celulele epiteliale (pentru detalii vezi textul): *A* — joncțiune strînsă; *B* — *zonula adherens*: *C* — *macula adherens*: *D* — joncțiune *gap*.

TABELUL 4. III

Dispozitive joncționale intercelulare speciale

Dispozitive joncționale de adezivitate
a) desmozomi în bandă *(zonula* sau *fascia adherens)*
b) desmozomi în „spot" *(macula adherens)*
c) hemidesmozomi
Dispozitive joncționale impermeabile
a) joncțiuni strînse *(zonula occludens)*
b) joncțiuni septate (numai la nevertebrate)
Dispozitive joncționale de comunicație
a) joncțiuni de tip *gap (macula communicans)*
Complexe joncționale

Desmozomii în centură (zonula adherens) formează o bandă continuă în jurul polului apical al fiecărei celule interrelată cu celulele vecine, pentru a alcătui un strat epitelial (fig. 4.25). În celulele adiacente, centurile sînt

Scanned with OKEN Scanner

direct apozabile și separate printr-un material de aspect filamentos (în spațiul intercelular) care leagă probabil membranele adiacente. În fiecare celulă, fascicule de filamente de actină sînt prezente în lungul centurii, imediat sub membrana plasmatică, fascicule care mediază probabil unul din procesele importante ale morfogenezei — plierea lamelor de celule epiteliale în tuburi

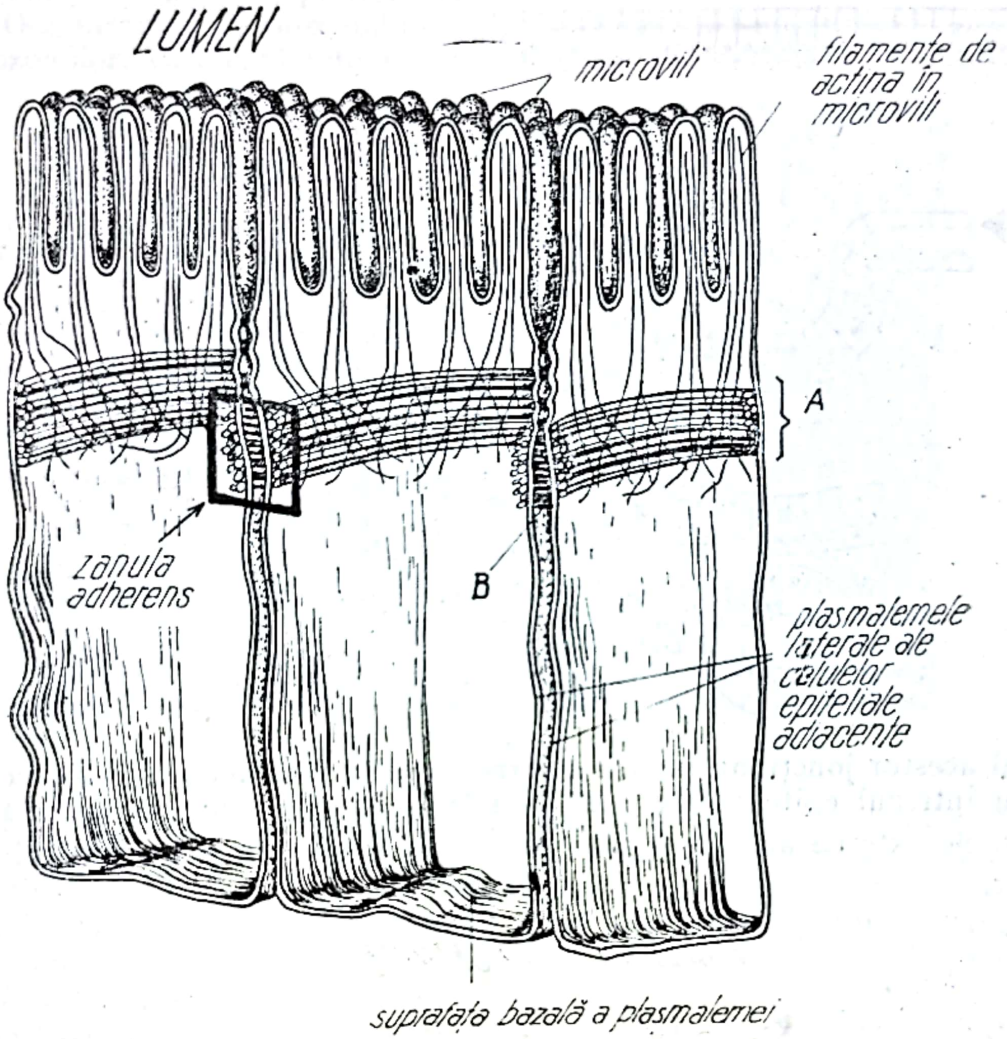


Fig. 4. 25. — Schema organizării (în spațiu) a desmozomului „în bandă" *(zonula adherens)*, aflat între celulele epiteliale ale intestinului subțire. Acest tip de joncțiune înconjură fiecare din celulele care intră în contact, fiind format din: *A* — un mănunchi contractil de filamente de actină care parcurg întreaga suprafață citoplasmică a plasmalemei, ce participă la formarea joncțiunii; *B* — un material filamentos în spațiul intercelular, între membranele care formează acest tip de joncțiune.

(fig. 4.26). De exemplu, o contracție dirijată a acestor fascicule de actină provoacă apariția tubului intestinal primitiv.

*Desmozomii în „spot"** *(macula adherens)* acționează ca niște „nituri", pentru a menține celulele împreună la punctele de închidere a legăturilor.

* *Spot*=pată (engl.).

La nivelul maculei *adherens*, pe versantul intern al membranei plasmatice, se ancorează filamente (tonofilamente) citoplasmatice formate din citokeratină, care traversează citoplasma în fascicule de la un desmozom la altul, formînd o țesătură intracelulară. Astfel, rețeaua de filamente de citokeratină din citoplasma celulelor adiacente este conectată indirect, prin inter-

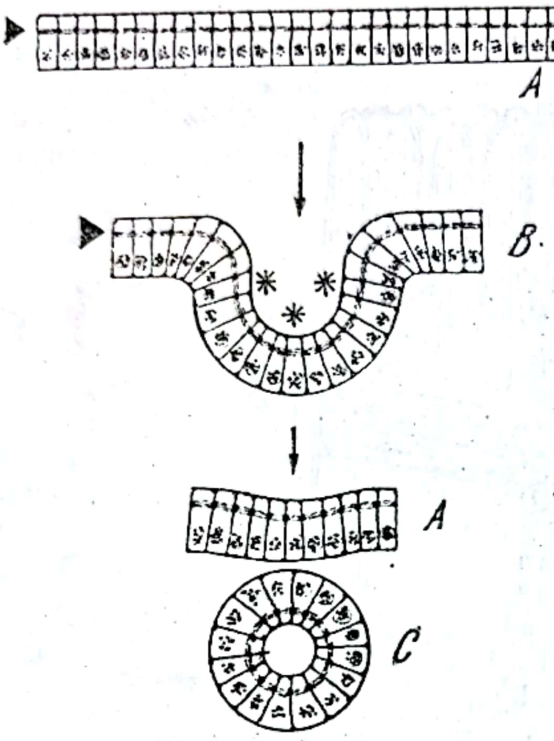


Fig. 4. 26. — Reprezentarea schematică a formării unui tub epitelial (*C*) dintr-o foiță epitelială (*A*), ca de exemplu formarea tubului neural. Contracția mănunchiului filamentelor de actină (▲), care sînt dispuse în lungul desmozomilor în bandă, produce îngustarea apicală a celulelor în anumite regiuni ale foiței epiteliale (*). Se formează la început o invaginare a acesteia (*B*) și apoi un tub (*C*), care se desprinde ulterior de foița epitelială din care s-a format.

mediul acestor joncțiuni, pentru a forma o rețea continuă de fibre, comună pentru întregul epiteliu (fig. 4.27 și 4.28). Alte filamente se ancorează pe versantele externe ale membranei, la același nivel, traversînd spațiul intercelular.

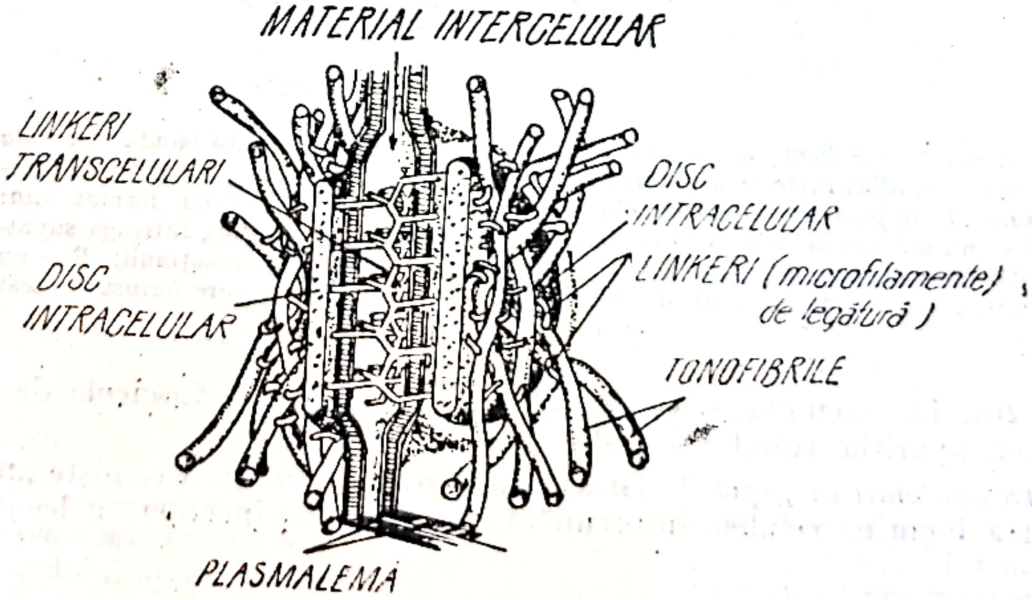


Fig. 4. 27. — Schema desmozomului „în pată" *(macula adherens)*.

Scanned with OKEN Scanner

Hemidesmozomii se aseamănă cu desmozomii în spot, însă în loc să lege membranele celulelor epiteliale adiacente, ei leagă suprafața bazală a celulelor cu membrana bazală. Împreună, desmozomii și hemidesmozomii acționează ca „nituri" care distribuie forțele de forfecare în întregul epiteliu și în țesutul conjunctiv subiacent, ca într-un tot. Aspectul desmozomilor în bandă și în spot este prezentat în fig. 4.25 și 4.27.

Organizarea desmozomului în pată reprezintă prototipul alcătuirii desmozomilor. În esență este alcătuit din: *a)* membranele plasmatice adia-

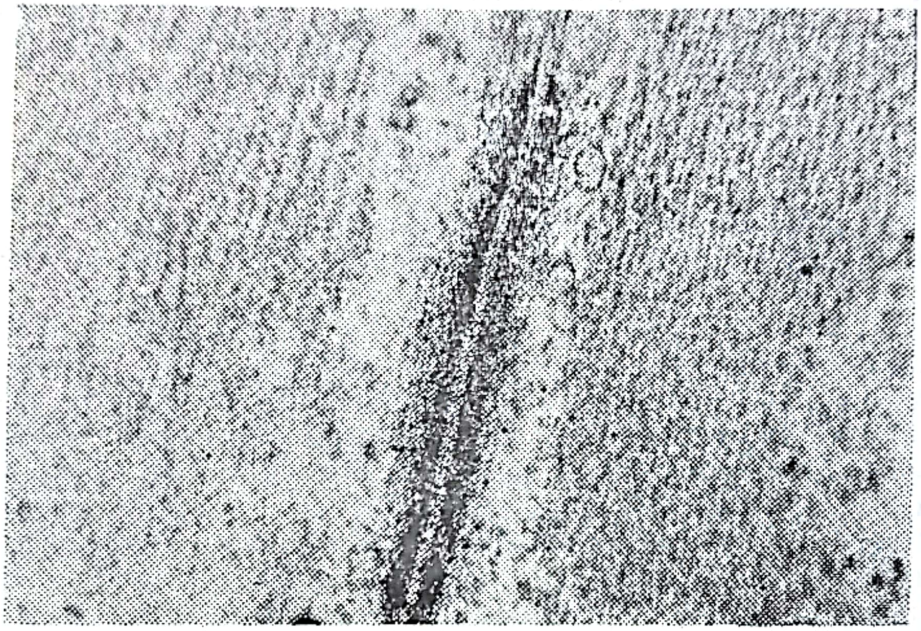


Fig. 4. 28. — Desmozom (electronomicrografie × 16 000).

cente, așezate paralel la o distanță constantă de 25—30 nm; *b)* un material intercelular, de aspect filamentos, dens la fluxul de electroni, bisectat de o densificare centrală, bogat în glucide și calciu; *c)* densificări în formă de disc (placă) pe frontul citoplasmatic, care sînt alcătuite din proteine numite desmoplachine, cu o greutate moleculară de respectiv 205 000 daltoni, 230 000 daltoni, 82 000 daltoni (pH bazic) și 86 000 daltoni (pH neutru); *d)* elemente citoscheletale reprezentate din filamente de citokeratină (tonofilamente) sau filamente de actină care se atașează densificărilor în formă de disc; *e)* dispozitive de legătură (engl. *linker)* reprezentate de microfilamente scurte, care fac legătura între tonofibrile și materialul fibrilar intercelular, traversînd discurile dense de pe frontul citoplasmatic și membrana plasmatică.

În desmozomi au fost identificate trei glicoproteine cu greutate moleculară de respectiv 150 000, 115 000 și 110 000 daltoni. Ultimele două glicoproteine se află la suprafața membranelor plasmatice și au fost denumite desmocolina I și II, pentru rolul lor în adezivitatea la nivelul desmozomului.

În cursul *genezei* dispozitivelor desmozomale se pot distinge trei faze: *faza I* este caracterizată de apariția filamentelor de legătură din spațiul extracelular; *faza a II-a* este caracterizată de apariția discului electronodens pe frontul citoplasmatic al membranelor adiacente; *faza a III-a*, sau faza de maturare, se distinge prin apariția liniei mediane electronodense în spa-

Scanned with OKEN Scanner

țiul intercelular și prin inserarea filamentelor citoplasmatice pe frontul intern al membranei, trecînd prin discul dens de la acest nivel. Pentru neoformarea desmozomilor (atît în condiții normale cît și în cursul regenerării epiteliilor de la suprafața rănilor) este necesară prezența ionilor de calciu, precum și a calmodulinei (o proteină citoplasmatică cu afinitate pentru calciu).

La concentrații scăzute de calciu sau în prezența unor substanțe care blochează calmodulina, este încetinită neoformarea desmozomilor imaturi, este împiedicat procesul de maturare a desmozomilor, fiind blocată migrarea fasciculelor de filamente citoplasmatice din jurul nucleului către periferia celulei, pentru a se insera pe discurile dense desmozomale.

4.4.2.2. Dispozitive joncționale impermeabile

4.4.2.2.1. Joncțiunea strînsă reprezintă o barieră pentru permeabilitatea transepitelială pe calea paracelulară

În ciuda marilor diferențe biochimice și morfologice, epiteliile au cel puțin o funcție importantă comună — ele servesc ca barieră foarte selectivă a permeabilității, separînd fluidele din compartimente diferite ale corpului și menținînd importante diferențe de compoziție chimică între acestea. *Joncțiunile strînse (zonula occludens)* mențin funcția de barieră selectivă a epiteliilor. De exemplu, celulele epiteliului intestinal trebuie să mențină conținutul intestinal în lumenul intestinului, totodată celulele trebuie să pompeze selectiv substanțele nutritive prin traversul epiteliului către fluidul extracelular din partea opusă, de unde ele sînt absorbite în sînge. Acest transport se face prin interiorul celulei și depinde de două seturi diferite de proteine specializate în transportul transepitelial: una este limitată la suprafața apicală a celulelor epiteliale (suprafața dinspre lumen) și pompează selectiv molecule din lumen în interiorul celulei; cealaltă, care este limitată la plasmalema bazală și laterală (fața bazolaterală a celulei), pompează substanțele din citoplasmă în afară, în lichidul extracelular, spre vasele sanguine din țesutul conjunctiv subiacent (fig. 4.29). Este clar că, pentru a menține direcția de pompare, setul de pompe apicale (proteine integrale ale plasmalemei) trebuie să fie împiedicate să difuzeze prin *continuum*-ul lipidic spre suprafața latero-bazală a celulei, de asemenea setul de pompe de pe fața bazolaterală trebuie să fie împiedicat să difuzeze spre apex. *Zonulae occludentes* fac posibil transportul selectiv transepitelial prin două mecanisme. În primul rînd ele împart membrana celulară în domenii distincte, servind ca barieră pentru difuziunea în bistratul lipidic a proteinelor membranei plasmatice. Astfel, ele împiedică transportul proteinelor prin translație de pe domeniul apical pe cel latero-bazal și vice-versa (vezi fig. 4.29). În al doilea rînd, constituie dispozitive de etanșare, legînd fiecare celulă cu celulele vecine și limitînd astfel difuzarea substanțelor prin spațiul intercelular, adică dinspre compartimentul luminal spre cel serosal și vice-versa. La nivelul joncțiunilor strînse, membranele plasmatice ale celulelor adiacente sînt atît de strîns apropiate, încît spațiul este redus la aproximativ 2,5 nm. Dacă un *marker* dens la fluxul de electroni ajunge pe o suprafață a epiteliului,

Scanned with OKEN Scanner

el nu poate trece pe fața cealaltă (fig. 4.30). Joncțiunile strînse pot fi rupte fie prin tratarea cu enzime proteolitice, fie prin agenți chelatori ai Ca^{2+} și Mg^{2+}, încît se presupune că pentru organizarea lor sînt necesare atît proteine speciale, cît și acești cationi bivalenți.

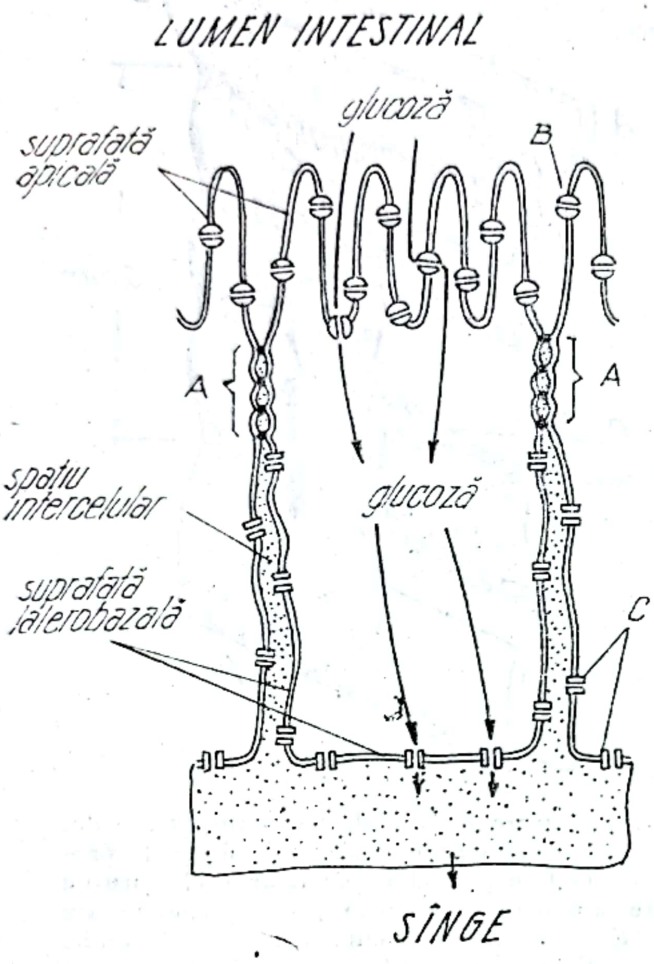


Fig. 4. 29. — Reprezentare schematică a unei celule epiteliale intestinale, arătînd că joncțiunile strînse (*A*) limitează prezența unor proteine transportoare numai la anumite regiuni ale plasmalemei. În exemplul ilustrat aici, glucoza este transportată activ în celulă prin proteinele cu rol de pompă activă *(B)* aflată la polul apical, și o părăsește prin difuziune facilitată, mediată de proteinele care transportă glucoza pasiv *(C)*, aflată în regiunea latero-bazală a celulei.

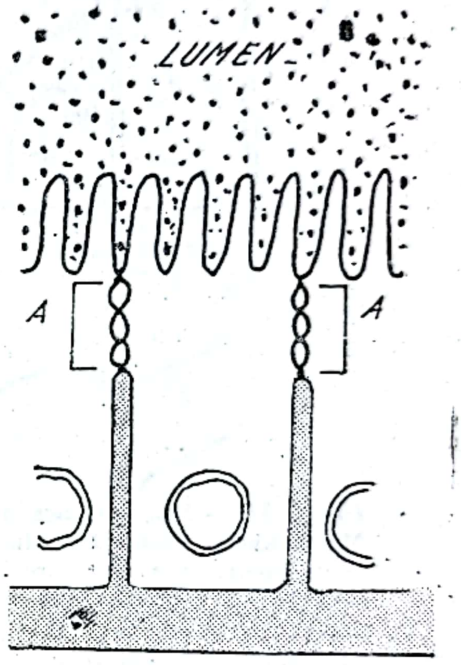


Fig. 4. 30. — Schemă arătînd că moleculele solubile, aflate în contact cu fața luminală a unui strat de celule epiteliale, nu pot trece dincolo de joncțiunile strînse *(A)* care unesc între ele aceste celule.

Conform interpretării imaginilor electronomicroscopice, *zonulae occludentes* constau din șiruri de proteine specifice din membranele plasmatice ale celulelor adiacente. Ele stabilesc contacte directe între celule, traversînd spațiul intercelular și alcătuind legături ca între dinții unui fermoar. Prin fracturare-congelare, la microscopul electronic de baleiaj, aceste proteine se disting ca șiruri lineare de particule intramembranare. O structură în formă de cordon, compus din mai multe șiruri suprapuse de astfel de particule, încercuiește complet fiecare celulă din epiteliu. Pe frontul citoplasmatic, șirurile

Scanned with OKEN Scanner

de proteine sînt ancorate de citoscheletul celular (fig. 4.31). În conformitate cu ipoteza lui Pinto da Silva și Kaschar (1982), particulele proteice ale joncțiunilor strînse ar fi înconjurate de micelii lipidice sub formă de cilindri, înglobați

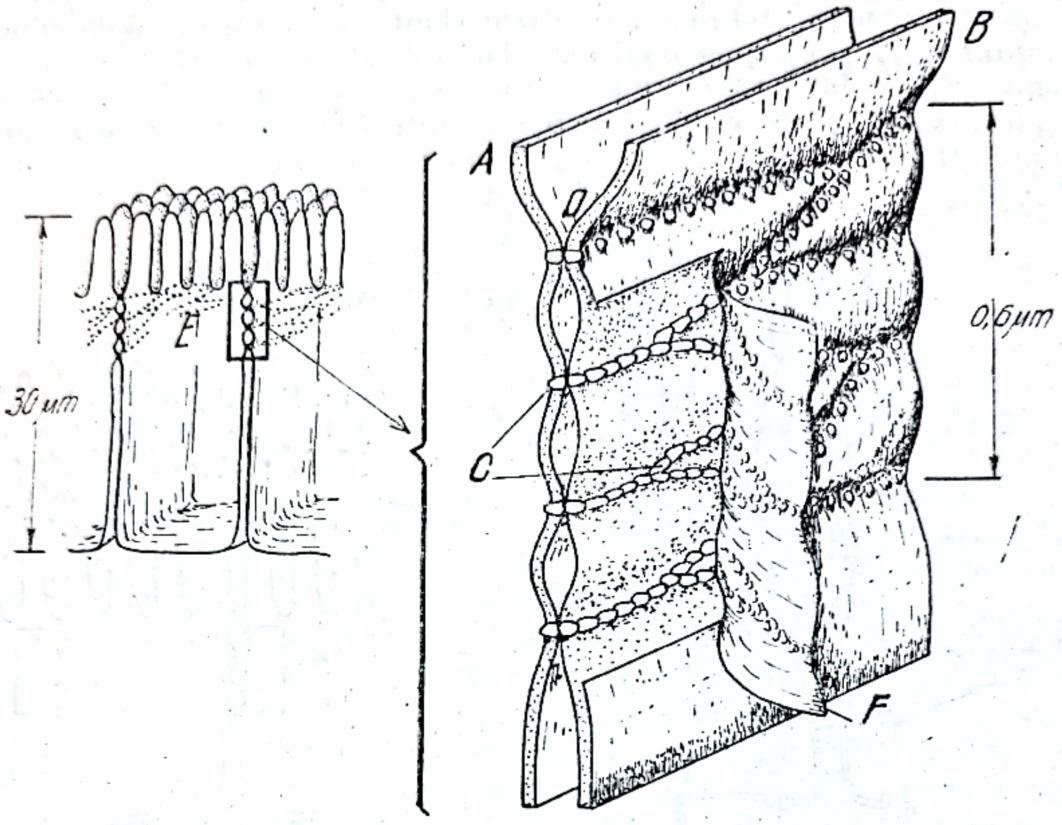


Fig. 4. 31. — Schema unei joncțiuni strînse între două celule epiteliale intestinale. Membranele plasmatice adiacente *(A* și *B)* sînt împreunate prin șiruri de proteine joncționale *(C)* care intră în contact în spațiul intercelular *(D)*. Șirurile de proteine joncționale anastomozate se dispun ca o centură, înconjurînd fiecare celulă a stratului de celule epiteliale *(E)*. Stratul citoplasmic al bistratului lipidic *(F)* din membrana *B* a fost „îndepărtat" pentru a evidenția șirurile de proteine joncționale *(C)*.

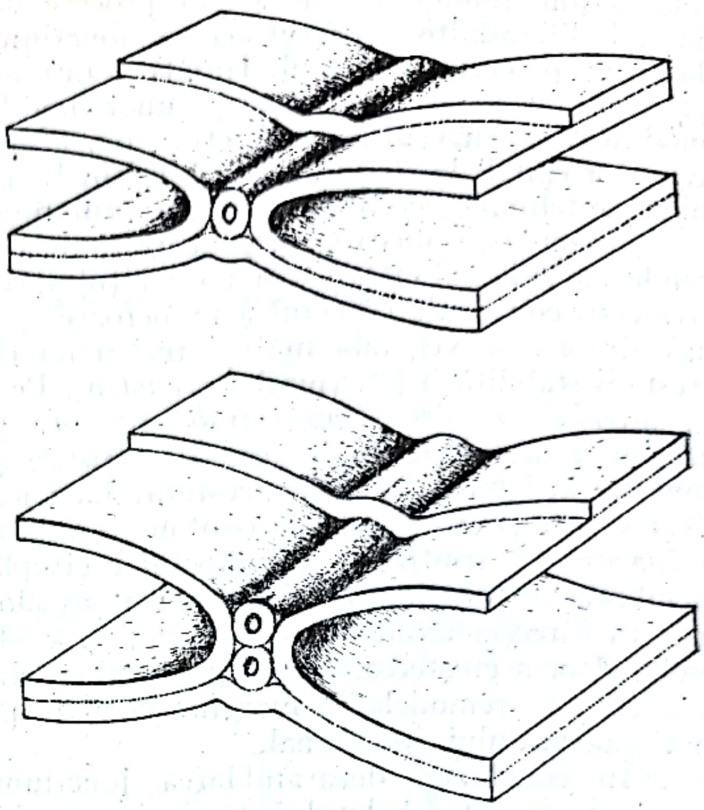
între fețele membranelor adiacente (fig. 4.32). La locul joncțiunii, jumătățile externe ale membranelor plasmatice alăturate fuzionează într-o foiță continuă și includ cilindrii lipidici cu moleculele inversate. Stabilitatea joncțiunilor este menținută de proteine integrale transmembranare. Acestea, la locul de joncțiune, traversează cilindrii lipidici și jumătățile interne ale membranelor joncționale (fig. 4.33), care interacționează pe fața citoplasmatică cu componente citoscheletale.

Proteinele integrale sînt implicate în formarea (și reconstituirea după reorganizare) a joncțiunilor strînse. Aceste proteine *nu* au un *turnover* rapid în condiții de echilibru fiziologic, pot fi distruse în cazuri speciale (sub acțiunea unor factori fizici sau chimici) și sînt resintetizate cu ușurință, întrucît ARN-ul mesager care codifică proteinele implicate în formarea joncțiunilor *occludens*, este foarte stabil.

Zonulae occludentes reprezintă componenta paracelulară a barierei transepiteliale (atît în epiteliile de acoperire, cît și în cele de absorbție), fiind

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4.32. — Schema reprezentării tridimensionale a topografiei spațiilor polare și apolare ale *zonulei occlu entes.*



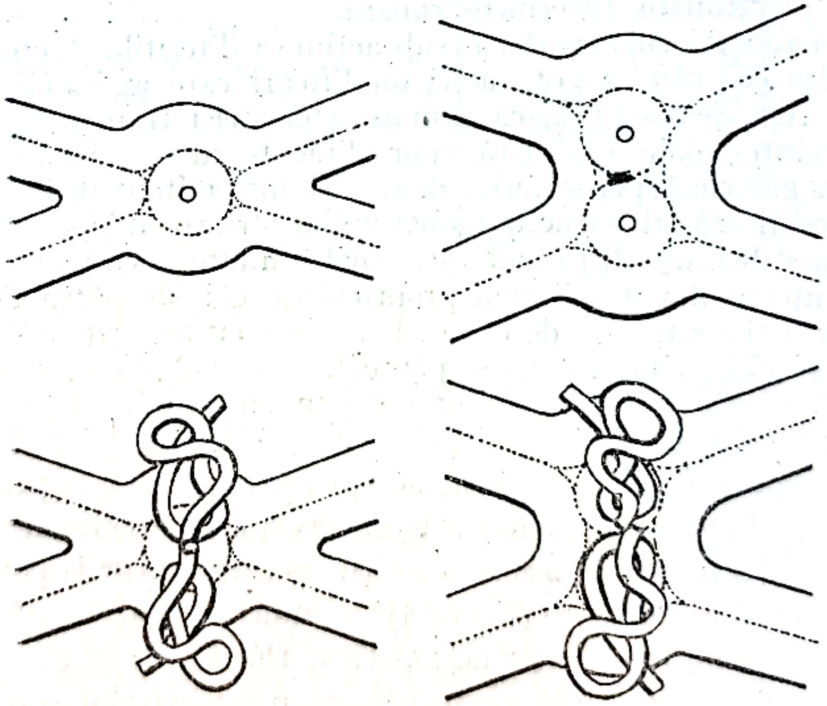


Fig. 4. 33. — Secțiune transversală în *zonula occludens* (schemă).

mai stabile ca poziție și configurație decît alte ansambluri macromoleculare ale membranelor plasmatice. De aceea, joncțiunile strînse în formă de benzi joacă rolul principal în împărțirea în domenii a suprafețelor celulelor. Cu toate acestea, ele prezintă și variații structurale. Remodelarea și dezasam-

Scanned with OKEN Scanner

blarea joncțiunilor *occludens* sînt procese naturale în cursul morfogenezei. În epiteliile adulte, aspectul acestor joncțiuni diferă în mod caracteristic de la un tip de epiteliu la altul. Totodată, în joncțiunile preexistente pot surveni alterări structurale, ca urmare a unor modificări fiziologice. Așa este cazul modificărilor survenite în structura joncțiunilor *occludens* în cursul evoluției celulelor epiteliale ale vilozității intestinale, precum și restructurarea joncțiunilor epiteliului secretor mamar, ca urmare a declanșării lactației.

Elucidarea mecanismelor care stau la baza controlului exercitat de celule asupra stabilității sau modulațiilor (fluctuațiilor) joncțiunilor de tip *occludens* constituie obiectul a numeroase speculații. S-a constatat că *citokinele* de origine vegetală măresc rezistența electrică transepitelială pe calea creșterii stabilității joncțiunilor *occludens*. Pe de altă parte, scăderea *calciului extracelular* are drept consecință creșterea permeabilității intercelulare, ca urmare a destabilizării joncțiunilor strînse și, în ultimă analiză, a ruperii continuității morfologice a acestora. La chelarea calciului extracelular (cu EGTA) celulele răspund printr-o succesiune de evenimente la nivelul zonulei *occludens*: *a)* contracția centripetă a citoplasmei creează tensiune asupra membranelor joncționale și deplasarea șirurilor de molecule integrale joncționale în direcția axului de tracțiune; *b)* destabilizarea pozițiilor joncțiunii, probabil prin creșterea fluidității membranei, fragmentarea benzilor joncționale etc.; *c)* remodelarea marginii celulare prin producerea de prelungiri și mărirea spațiului joncțional.

În concluzie, dezasamblarea joncțiunilor este consecința tensiunii centripete a citoscheletului periferic, combinată cu destabilizarea șirurilor de molecule joncționale intermembranare.

Cercetări recente sugerează că, sub acțiunea diferiților factori fizici sau chimici, *zonulae occludentes* pot suferi modificări care au implicații asupra funcțiilor lor. Așa, de exemplu, ca urmare a creșterii tranzitorii a presiunii osmotice intraintestinale (datorită unor alimente cu osmolaritate mare sau a conținutului gastric hiperosmotic, descărcat intermitent în intestinul proximal) este modificată atît structura joncțiunilor strînse cît și selectivitatea lor față de diferite substanțe din sucul intestinal. Cu alte cuvinte, modificări ale conținutului intestinal pot schimba proprietățile căii de pătrundere paracelulară. Ele par a fi controlate de către elementele citoscheletale și se însoțesc de modificarea selectivității lor. Se poate face speculația că fluctuațiile în selectivitatea barierei paracelulare pot servi, în anumite limite, ca mecanism protector care reglează regimul de pătrundere a substanțelor din lumenul intestinal prin epiteliu. De asemenea, aceste fluctuații pot conduce la transferul apei, fără dezvoltarea unui gradient electric transepitelial. În sfîrșit, modificările în selectivitatea permeabilității pentru cationi pot avea un efect protector față de fluxul de ioni de H^+ în mucoasa intestinală, care însoțește încărcătura osmotică de origine gastrică. După cum se știe, leucocitele polimorfonucleare sînt capabile să traverseze orice epiteliu din organism, fără discriminare, iar intensificarea acestui proces are loc în inflamațiile acute. Cercetările au dovedit că numărul polimorfonuclearelor, care traversează un anumit epiteliu, este în relație directă cu numărul și integritatea morfofuncțională a *zonulelor occludentes* din epiteliul respectiv. În timpul migrări transepiteliale a polimorfonuclearelor, se mențin contacte strînse cu celulele

Scanned with OKEN Scanner

epiteliale, pentru a se preveni scurgerea de particule (mai mari de 5 nm în diametru) prin locul de invazie a leucocitului.

La nevertebrate, se întîlnesc *joncțiuni septate* în locul joncțiunilor strînse, care servesc ca dispozitive de solidarizare a straturilor celulare.

4.4.2.3. Dispozitive joncționale de comunicație

4.4.2.3.1. Joncțiunile de tip *gap* permit moleculelor mici să treacă de la o celulă la alta

Joncțiunile de tip gap, nexus sau macula communicans sînt cele mai obișnuite tipuri de joncțiuni celulare, foarte larg distribuite în țesuturile animale. Ele mai sînt denumite și joncțiuni comunicante, pentru că permit moleculelor mici, solubile în apă, să treacă direct din citoplasma unei celule în citoplasma celulei învecinate, în acest fel cuplînd celulele atît metabolic cît și electric (fig. 4.34). Dacă doi electrozi sînt plasați în două celule aflate la o oarecare distanță, într-o lamă de țesut epitelial, pulsul electric indus în una, poate fi detectat în cealaltă; celulele sînt cuplate electric (fig. 4.34). Pulsul nu poate

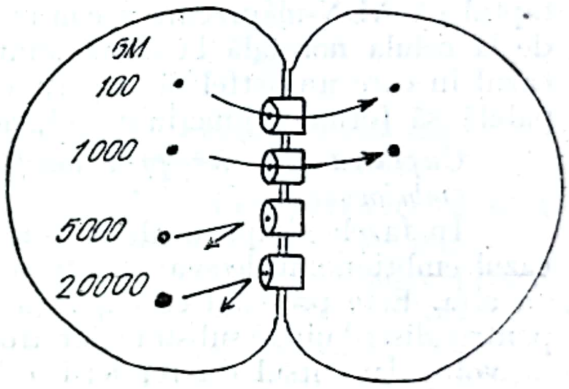


Fig. 4.34. — Permeabilitatea joncțiunii *gap*: moleculele cu diametrul mai mare de 1 500 daltoni nu pot trece dintr-o celulă în alta.

fi detectat nici în fluidul luminal și nici în țesutul conjunctiv de sub membrana bazală. Dacă într-o celulă epitelială sînt injectate mici molecule fluorescente, cum este cazul fluoresceinei, acestea se vor răspîndi rapid în celulele epiteliale alăturate, dar nu și în spațiul extracelular adiacent. Atunci cînd sînt injectate molecule fluorescente, se constată că moleculele mai mici de 1 000—1 500 daltoni pot trece de la o celulă la alta, în timp ce moleculele mai mari nu pot trece. Aceasta sugerează că mărimea canalelor de legătură ale „porilor" funcționali este de circa 1,5 nm. O astfel de mărime a porului presupune că celulele cuplate schimbă o diversitate de molecule mici (ioni anorganici, glucide simple, aminoacizi, nucleotide și vitamine), însă nu pot schimba între ele macromolecule (proteine, polizaharide, acizi nucleici).

În principiu, acest tip de cuplare poate permite *cooperarea metabolică* între celule, deoarece micile molecule intracelulare, elaborate numai de către o subpopulație de celule dintr-un țesut, pot fi transferate în alte celule, din același țesut. O asemenea cooperare intercelulară poate fi demonstrată în culturi de celule. De exemplu, o linie de celule mutante căreia îi lipsește enzima timidinkinază, este incapabilă să încorporeze timidina radioactivă

Scanned with OKEN Scanner

în ADN-ul său. Însă dacă astfel de celule sînt cultivate împreună cu celule normale (care au timidinkinază) și apoi expuse timidinei radioactive, autoradiografiile evidențiază radioactivitatea celulelor mutante care au venit în contact direct cu celulele normale (fig. 4.35). Această observație implică

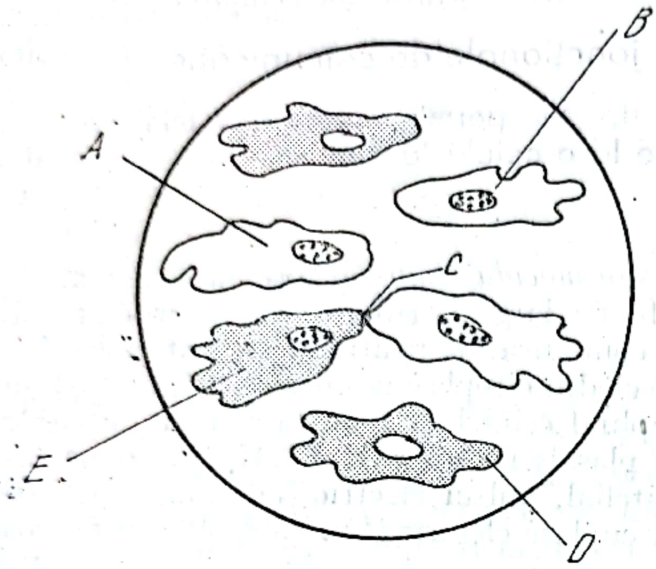


Fig. 4.35. — „Cooperare metabolică intercelulară", demonstrată *in vivo* pe culturi de celule:
A — celulă normală; *B* — granule radioactive cu nucleul celulei normale; *C* — joncțiune *gap*; *D* — celulă mutantă; *E* — celula mutantă, cuplată prin joncțiune *gap* cu o celulă normală, conține granule radioactive în nucleu.

faptul că ADN-ul precursor conținînd timidină radioactivă, a trecut direct de la celula normală la celula mutantă care a venit în contact cu ea. În cazul în care un astfel de experiment este efectuat cu celula mutantă incapabilă să formeze joncțiuni *gap*, această cooperare metabolică nu are loc.

Cuplarea celulelor prin joncțiuni gap *prezintă o mare importanță în embriogeneză*

În fazele timpurii ale embriogenezei (încă din stadiul de 8 celule, în cazul embrionului de șoarece), majoritatea celulelor sînt cuplate electric una cu alta. Este probabil că cuplarea metabolică reprezintă o importantă cale pentru distribuirea substanțelor trofice, înainte ca sistemul circulator să se dezvolte. În cursul diferențierii, celulele unui țesut sau organ aflat în dezvoltare normală, își mențin joncțiunile proprii, dar își sistează legăturile cu țesuturile înconjurătoare, reflectînd prin aceasta identitatea proprie de țesut separat. De exemplu, de îndată ce tubul neural se închide, celulele sale se decuplează de celulele epiteliale ectodermice de acoperire, fiecare țesut menținîndu-și și diferențiindu-și numai comunicațiile intercelulare proprii.

În unele cazuri, celulele se cuplează temporar în anumite faze ale dezvoltării lor. Este probabil că aceste cuplări tranzitorii constituie căi prin care celulele „se recunosc" una pe alta.

În alte cazuri, cuplarea celulelor embrionare poate constitui o cale de transmitere a semnalelor la distanță. Prin joncțiunile *gap* mici molecule pot trece de la o regiune a unui țesut, în care concentrația lor intracelulară este ridicată, la o regiune în care concentrația este menținută redusă, prin aceasta egalînd (nivelînd) gradientul de concentrație.

Concentrațiile locale pot conferi unor celule „poziții informaționale" de control al diferențierii, după localizarea lor în interiorul embrionului. În dezvoltarea plăcii neurale, de exemplu, în care celulele sînt cuplate electric, celulele cu diferite poziții de-a lungul plăcii au potențiale de membrană diferite. Aceasta implică gradiente de concentrații ionice diferite în lungul plăcii,

care pot avea drept consecință dezvoltări diferite ale grupelor de celule (fig. 4.36).

Celulele pot controla permeabilitatea joncțiunilor lor de tip gap.

Permeabilitatea joncțiunilor de tip *gap* este rapid (în secunde) și reversibil descrescută, dacă în condiții experimentale este scăzut pH-ul intracelular sau dacă crește concentrația ionilor de calciu. Cercetări recente atestă că substituenții benzil-acetaților reduc conductanța joncțiunilor *gap* ca urmare a acidifierii citoplasmei (Spray și colab., 1984). Este foarte probabil că această acidifiere se datorează hidrolizei esterilor respectivi de către esterazele intracelulare. Aceste observații sugerează posibilitatea ca joncțiunile *gap* să fie structuri dinamice, a căror permeabilitate să poată fi controlată de înseși celulele prevăzute cu astfel de joncțiuni.

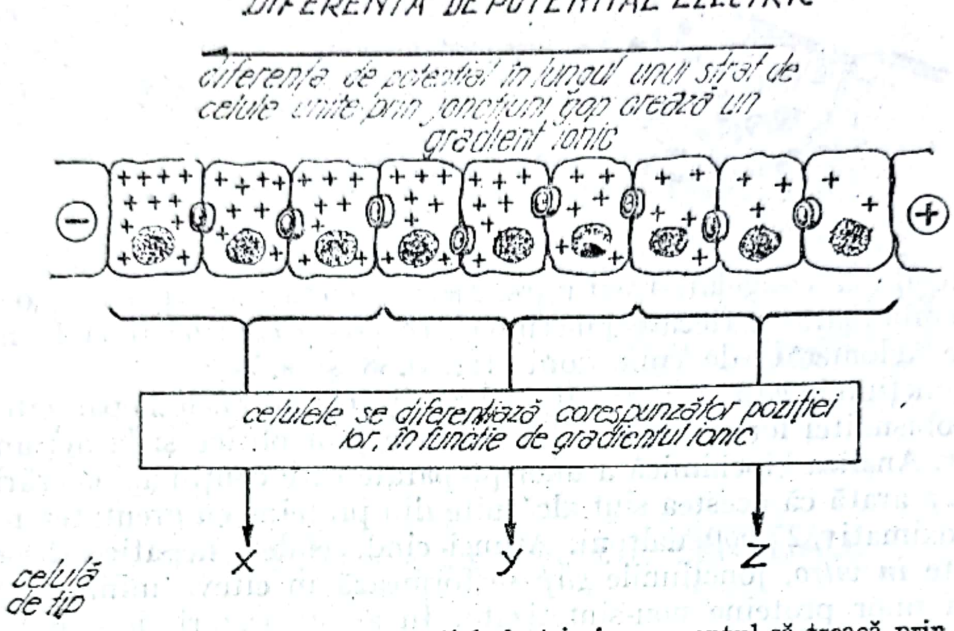


Fig. 4. 36. — O diferență de potențial electric face curentul să treacă prin joncțiunile *gap*, creînd un gradient ionic în celulele astfel cuplate.

Există cel puțin o împrejurare în care controlul ionic al cuplării celulare pare să fie crucial. Dacă o celulă moare sau este lezată, este foarte important ca ea să fie rapid decuplată de cele învecinate. Se presupune că aceasta se efectuează printr-o creștere marcată a calciului intracelular, fie prin influx prin membrana lezată, fie pentru că celula nu mai este capabilă să pompeze Ca^{2+} afară din citosol, cu eficiență.

Joncțiunile gap *sînt alcătuite din canale care leagă direct interiorul celulelor ce interacționează*

Așa cum reiese din fig. 4.37, joncțiunile *gap* sînt alcătuite din proteine comune celor două membrane plasmatice adiacente, pentru a forma structuri denumite *connexoni*, care leagă interiorul celor două celule printr-un canal hidrofil continuu. Probabil că fiecare celulă din cele două care interacționează, sintetizează proteinele ce alcătuiesc jumătate din canalul connexonului. Connexonii stabilesc astfel de legături între cele două celule, încît, spre deosebire de joncțiunile strînse, membranele plasmatice care interacționează sînt separate de un *gap* de 2—4 nm (de unde și numele de joncțiuni *gap*), astfel încît moleculele relativ mari pot pătrunde cu ușurință printre membranele plasmatice dintre connexoni. În electronomicrografiile

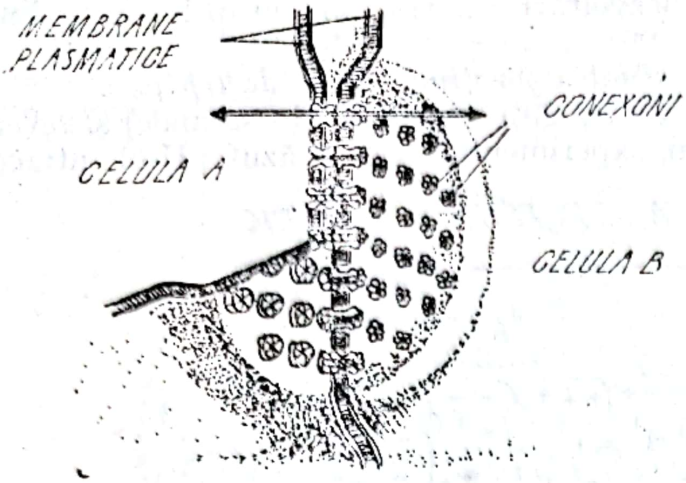


Fig. 4. 37. — Schema organizării moleculare a unei joncțiuni *gap*.

obținute după congelare-fracturare, fiecare connexon apare ca o particulă intramembranară și fiecare joncțiune *gap* poate conține pînă la mai multe sute de aglomerări de connexoni (fig. 4.38 și 4.39).

Joncțiunile *gap* au putut fi izolate din membranele hepatocitelor, datorită neobișnuitei lor rezistențe la enzimele proteolitice și la acțiunea detergenților. Analiza biochimică a unor preparate care conțin aglomerări de joncțiuni *gap* arată că acestea sînt alcătuite din proteine cu greutatea moleculară de aproximativ 27 000 daltoni. Atunci cînd celulele hepatice disociate sînt cultivate *in vitro*, joncțiunile *gap* se formează în cîteva minute, chiar și în absența unor proteine nou-sintetizate. În aceste cazuri, joncțiunile se formează prin autoasamblarea unor subunități preformate, care difuzează în planul membranelor, fiind „trase" de către filamentele citoscheletale, pentru a fi alăturate strîns la nivelul membranelor apoziționate.

În fig. 4.24 sînt prezentate schematic diferitele tipuri de joncțiuni care pot fi întîlnite în membranele epiteliale.

Fig. 4. 38. — Joncțiune *gap* (▲) între două celule endoteliale (arteoriolă, electronomicrografie × 7 200).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4. 39. — Joncțiune *gap*, detaliu din figura 4.38 (electronomicrografie × 33 000).

4.4.3. POLARITATEA CELULELOR EPITELIALE

Organizarea polarizată este proprietatea cea mai izbitoare a celulelor epiteliale, manifestată nu numai prin localizarea caracteristică a organitelor intracelulare, ci și prin alcătuirea diferită a membranei plasmatice apicale, laterale și bazale, precum și prin structuri asociate fiecăreia din acestea (fig. 4.40).

Fig. — 4.40. Epiteliu cubic simplu (duct intercalat, pancreas, electronomicrografie × 2 000). Polul apical, care delimitează lumenul canalului, are un aspect deosebit față de suprafața latero-bazală.

4.4.3.1. Suprafața celulelor epiteliale este împărțită în domenii

Specializarea funcțională a epiteliilor ca: absorbția, secreția și transportul transepitelial, sînt dependente de existența a *două domenii* principale, distincte, ale suprafeței celulelor componente: *domeniul apical* și *domeniul latero-bazal*. Domeniile respective sînt separate prin benzi circulare de joncțiuni strinse *(zonula occludentes)*. Cele două domenii se află în contact cu medii extracelulare diferite și fiecare implică existența unor componente structurale și chimice specifice, componente responsabile de proprietățile fiziologice speciale ale celulei respective.

La examenul ultrastructural, diferitele tipuri de celule epiteliale prezintă o *polaritate structurală*, exprimată prin prezența microvililor și a cililor la polul apical, în timp ce joncțiunile intercelulare sînt localizate pe suprafața latero-bazală. Polaritatea structurală poate fi distinsă și la examenul electromicroscopic al secțiunilor obținute prin congelare-fracturare, deoarece densitatea moleculelor de proteine membranare este mult mai mare în membrana latero-bazală, față de membrana plasmatică apicală.

Studiile biochimice ale preparatelor de membrane bazolaterale ale nefrocitelor din tubul contort proximal și ale enterocitelor, am arătat o compoziție diferită a principalelor domenii ale membranelor plasmatice, fiecare domeniu avînd setul său caracteristic de *enzime, polipeptide și lipide*. Distribuția asimetrică a componentelor suprafeței celulare a fost confirmată și pe calea histo-autoradiografică, precum și imunohistochimică.

4.4.3.2. Zonulele occludens și polaritatea epitelială

Cu toate că polaritatea suprafeței celulelor epiteliale a fost bine documentată structural și biochimic, pînă în ultimii ani au existat puține indicații asupra proceselor celulare, implicate în biogeneza separării chimice a celor două domenii principale — apical și latero-bazal.

Mai întîi s-a sugerat că joncțiunile *occludens* joacă un rol-cheie în menținerea polarității celulelor epiteliale, acestea acționînd ca bariere moleculare față de amestecul macromoleculelor mobile între domeniul apical și cel latero-bazal al plasmalemei. Această ipoteză a fost confirmată prin cercetările efectuate asupra celulelor epiteliale renale. Polaritatea morfologică a nefrocitelor constă în prezența a numeroși microvili la polul apical (organizați sub forma așa-zisei „margini de perie") și a numeroase digitații sau falduri pe fețele latero-bazale. Studiile biochimice și imunologice au demonstrat că pe cele două domenii (apical și latero-bazal) proteinele și lipidele membranare sînt asimetric distribuite. De asemenea, monostratul de nefrocite prezintă o rezistență electrică transepitelială de circa 100—300 ohm/cm², ceea ce demonstrează existența unor *zonulae occludentes* funcționale. Aceste date se sprijină pe studiile morfologice care arată că joncțiunile *occludens* asigură etanșeitatea spațiului dintre celulele adiacente.

Cercetări recente au demonstrat că existența funcțiunilor *occludens* complete este necesară pentru delimitarea domeniilor apical și latero-bazal ale membranelor plasmatice și că biogeneza polarității suprafeței celulelor epiteliale este un proces continuu.

Scanned with OKEN Scanner

4.4.3.3. Biogeneza polarității celulei epiteliale

Biogeneza polarității celulei epiteliale înseamnă, de fapt, biogeneza glicoproteinelor din membrana celulară, ceea ce implică sinteza acestor glicoproteine, dirijarea lor intracelulară și înglobarea lor vectorială în domeniul apical, respectiv latero-bazal.

Jamieson și Palade (1971) au demonstrat că exocitoza proteinelor de export este polarizată în celulele exocrine. Informațiile privind felul în care proteinele membranei celulare sînt dirijate și menținute în domenii specifice ale suprafeței celulare sînt încă insuficiente.

Teoretic, există trei posibilități principale: *a)* înglobarea vectorială într-unul din domeniile membranei celulare; *b)* înglobarea în membrana celulară fără preferință pentru un anumit domeniu și redistribuirea ulterioară pe domenii, prin mecanisme specifice; *c)* înglobarea vectorială a tuturor proteinelor într-un singur domeniu, urmată de redistribuirea proteinelor din celălalt domeniu, opus.

Majoritatea dovezilor experimentale existente conduc la un model (fig. 4.41) în favoarea primei ipoteze, adică: glicoproteinele apicale și respectiv latero-bazale sînt înglobate vectorial în domeniile lor. Acest fapt presupune dirijarea lor intracelulară, după ce au fost sintetizate în reticulul endoplasmatic rugos și maturate în aparatul Golgi. Sortarea lor are loc prin încorporarea în vezicule post-golgiene (macrovezicule) diferite, care vor fuziona cu domeniul-țintă corespunzător. Probabil că în aparatul Golgi există receptori specifici fie pentru proteinele apicale, fie pentru cele latero-bazale. Ei participă la „recrutarea" proteinelor corespunzătoare în vezicule post-golgiene diferite. La rîndul lor, aceste vezicule sînt capabile să fuzioneze specific cu domeniul apical, respectiv latero-bazal. Această ultimă ipoteză are nevoie de noi verificări experimentale. Se pare că „semnalul" pentru selec-

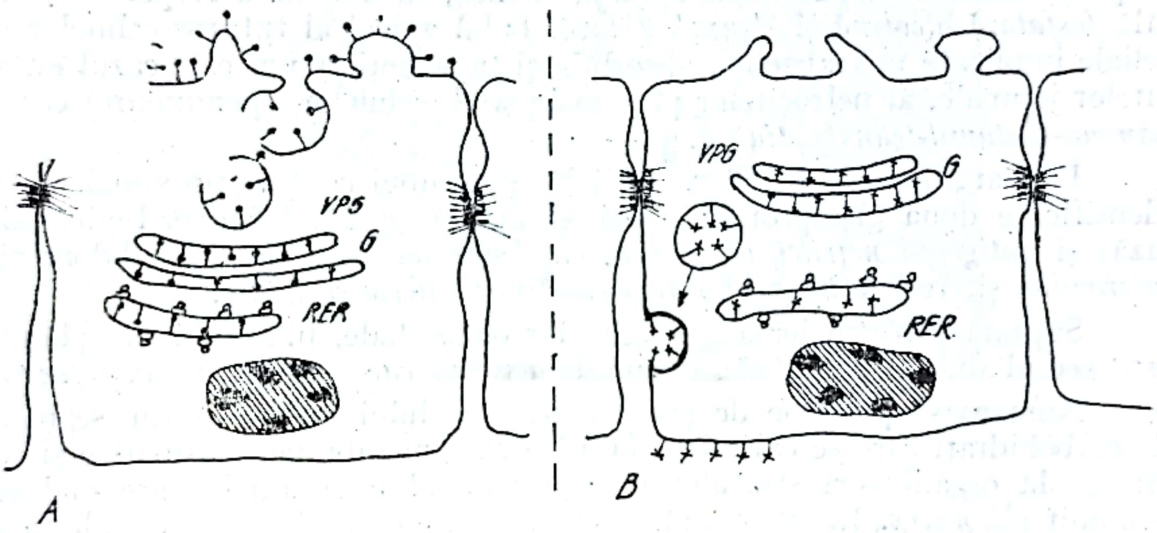


Fig. 4.41. — Înglobarea vectorială a glicoproteinelor membranare în domeniul apical *(A)*, respectiv latero-bazal *(B)*:
VPG — vezicule post-golgiene specifice;. — glicoproteine apicale; *x* — glicoproteine latero-bazale.
Probabil că receptorii specifici pentru fiecare tip de proteine, prezenți în aparatul Golgi *(G)*, participă la „sortarea" proteinelor în *VPG* diferite care fuzionează specific cu domeniile- „țintă". *RER* — reticul endoplasmatic rugos.

ționarea glicoproteinelor rezidă în însăși structura segmentului polipeptidic și că nu ar depinde de segmentul glucidic al glicoproteinelor.

Dacă există un transfer de glicoproteine membranare din domeniul apical în cel latero-bazal, sau invers, acesta are loc prin transcitoză și *nu* prin translație laterală în plasmalemă, care este sever limitată de prezența joncțiunilor strînse. Alternativa menționată, dacă este reală, se întîlnește cu frecvență nesemnificativă.

4.4.3.4. Membrana apicală

În numeroase celule epiteliale, membrana dinspre suprafața liberă sau luminală cuprinde proteine de membrană, diferite de membranele latero-bazale. Membranele plasmatice apicale ale epiteliului intestinal conțin proteine integrale, denumite *ligatine*, care leagă enzime (de exemplu: dizaharidaza care hidrolizează zaharurile absorbite în monozaharide).

Leucilaminopeptidaza este o glicoproteină plasmalemală integrală, localizată la nivelul domeniului apical al enterocitelor și al nefrocitelor și la polul biliar al hepatocitelor. De asemenea, în domeniul respectiv se mai află *fosfatază alcalină* și *5'-nucleotidază*. Polul apical al tuturor celulelor epiteliale implicate în transport, absorbție și în secreție (cum este cazul enterocitelor jejunale, al nefrocitelor proximale și al celulelor ependimare) conține *gamma-glutamil-transpeptidază*.

În marginea în perie a nefrocitelor din tubul contort proximal au fost identificate două glicoproteine mari, și anume *maltaza* (glicozil-glicohidrolază) și *antigenul nefritei Heymann*, care sînt *marker*-i pentru subdomeniile *microvilar* și, respectiv, cel al *invaginațiilor intermicrovilare*.

Suprafața plasmalemală a celulelor endoteliale, îndeosebi din plămîni, este sediul unei dipeptidaze, denumită *enzima care convertește angiotensina*.

Numeroase proteine de pe membrana polului apical conțin segmente de carbohidrați care se extind pe fața liberă a membranei plasmatice și contribuie la organizarea stratului PAS-pozitiv, al membranei, care mai este denumit *glicocalix*. În endoteliul vascular, numeroase glicoproteine ale membranei apicale conțin un reziduu terminal de acid sialic, care conferă o încărcătură net negativă suprafeței luminale a acestei celule (ca de altfel și în cazul altor celule). Încărcarea negativă are un rol protector al endoteliului, determinînd respingerea electrostatică a trombocitelor și a altor celule încărcate negativ și prevenind în acest fel atașarea lor, cu eliberarea consecutivă sau activarea factorilor plasmatici (cum este complementul), care pot altera endoteliul și elementele celulare subiacente. În celulele producătoare de mucus și în alte celule secretorii, cum sînt cele din arborele traheo-bronșic și din tractul digestiv (fig. 4.42), eliberarea produsului de secreție prin exocitoză are loc numai la polul apical al celulelor. Mucusul aderă la epiteliu, formînd un înveliș glicoproteic gros și vîscos, care are un rol protector contra traumelor mecanice și chimice, sau se poate deplasa în masă, de-a lungul suprafeței epiteliale, captînd și antrenînd particulele străine nefolositoare.

Membranele apicale ale unor celule prezintă unele formațiuni structurale — *specializări de suprafață* — care contribuie la îndeplinirea funcției lor speciale.

Scanned with OKEN Scanner

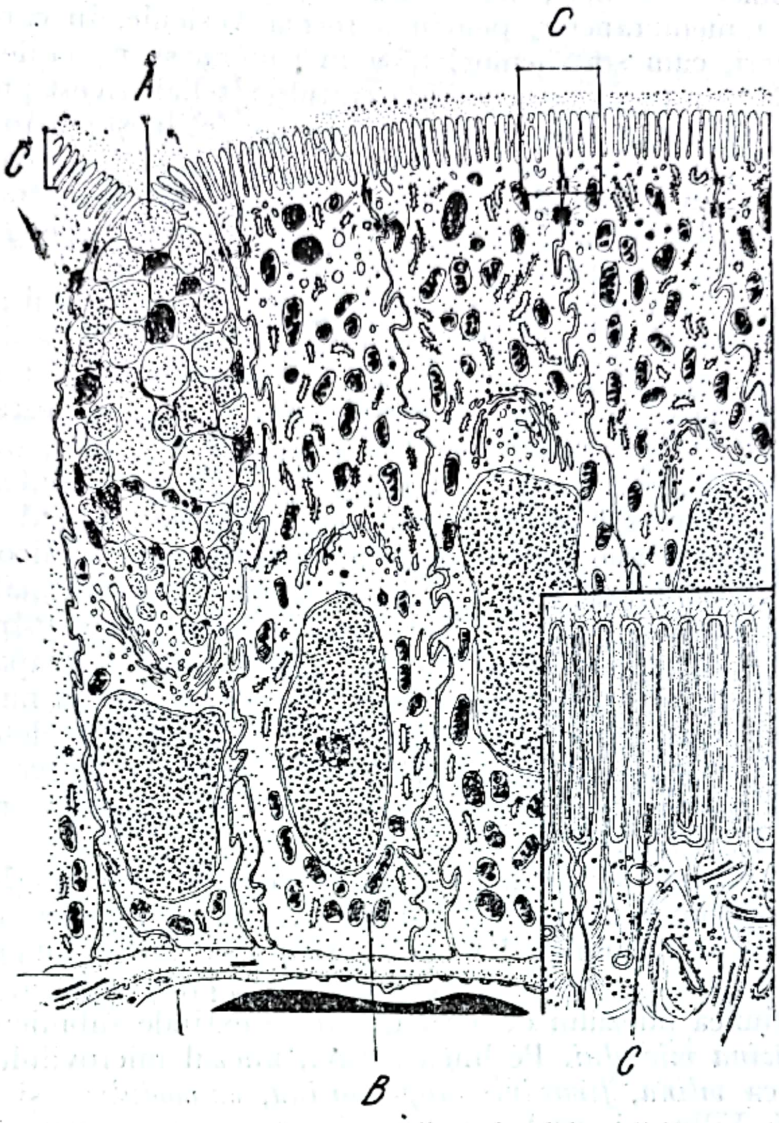


Fig. 4. 42. — Schema ultrastructurii unei celule caliciforme *(A)* și a celulelor epiteliale intestinale — enterocite *(B)*: *C* — detalii privind organizarea microvililor la polul apical al enterocitelor.

4.4.3.4.1. Microvilii

Aceste mici prelungiri, observabile distinct doar la microscopul electronic, în formă de deget de mănușă, situate pe fața apicală a celulelor epiteliale, sînt mai numeroase în celulele a căror funcție principală este cea de absorbție sau de transport transepitelial. Prezența microvililor la polul apical al acestor celulele are rolul a de mări suprafața membranei celulare apicale, prin care are loc absorbția. Microvilii sînt foarte numeroși și regulați în așa-numita margine în perie a nefrocitelor din tubii contorți proximali și, respectiv, în marginea striată a enterocitelor și a celulelor sinciție-trofoblastului placentar.

Așa cum s-a arătat mai înainte, membrana plasmatică a microvililor este adesea asociată cu enzime, care facilitează funcția de absorbție, ca de exemplu, fosfathidrolazele zaharurilor din microvilii enterocitelor, care transformă dizaharidele absorbite în monozaharide.

Scanned with OKEN Scanner

În celulele epiteliale, bazele microvililor sînt regiuni caracteristice de invaginare a membranelor, pentru a forma vezicule, în care substanțe cu molecule mari, cum sînt hemoglobina în rinichi și miceliile lipidice în intestin, pot fi transportate activ prin stratul epitelial. Acest proces este denumit în mod obișnuit *endocitoză*. Endocitoza se întîlnește și în alte celulele și ea implică uneori și o proteină denumită *clatrină*, care acoperă veziculele endocitotice. Veziculele cu clatrină mai sînt implicate în transportul intracelular de la reticulul endoplasmatic la aparatul Golgi și de la aparatul Golgi la plasmalemă.

4.4.3.4.1.1. *Marginea striată*. Este specializarea polului apical al celulei intestinale, adaptată funcției de absorbție. Denumirea ei se datorează aspectului la microscopul optic. Așa cum s-a mai menționat, la microscopul electronic s-a observat că marginea striată a enterocitelor este alcătuită din numeroase prelungiri în formă de deget, denumite microvili, aranjate ordonat, ceea ce conferă aspectul striat polului apical al acestor celule. Suprafața externă a microvililor este acoperită de o substanță întunecată, alcătuită din proteine și polizaharide, formînd un „acoperiș", denumit glicocalix, care este îngroșat de o substanță mucoasă elaborată de celulele caliciforme. Celulele caliciforme (fig. 4.42) sînt glande unicelulare diseminate printre enterocite.

S-a constatat că *in vitro* microvilii marginii striate sînt capabili de mișcări ritmice. Cu toate că semnificația exactă a acestor mișcări nu este elucidată pe deplin, în ultimul timp s-au făcut progrese în privința descifrării organizării moleculare a *citoscheletului microvililor marginii striate a enterocitelor*. Citoscheletul marginii striate poate fi sistematizat în două domenii — *miezul microvililor* și *trama terminală* (fig. 4.43).

Miezul microvililor conține fascicule centrale de cîte 20—30 de *filamente de actină*, uniform așezate, a căror extremitate se termină într-o *placă densă*, la vîrful microvilului. Fasciculele se extind în tot lungul microvilului și pătrund cu circa 1/4—1/3 din lungimea lor în citoplasma apicală a enterocitului. Porțiunea miezului de actină, care se extinde submicrovilar este denumită *rădăcina miezului*. Pe lîngă actină, miezul microvilului mai conține polipeptide ca *vilina*, *fimbrina*, *tropomiozina*, *calmodulina* și *polipeptida de 110 k-daltoni*. Vilina și, probabil, fimbrina se găsesc printre filamentele de actină, în lungul miezului microvilului. Polipeptida de 110 k-daltoni se asociază cu calmodulina și formează legături aranjate în spirală, care ancorează fasciculele de filamente de actină ale miezului de membrana plasmatică a microvilului.

4.4.3.4.1.2. *Trama terminală*. Citoplasma apicală, în care pătrund rădăcinile miezului, este denumită trama terminală. Aparatul citoscheletal din trama terminală poate fi subdivizat în două subdomenii: unul este denumit *zona dintre rădăcini*, iar celălalt — *complexul joncțional* de la marginea celulei.

La nivelul *zonei dintre rădăcini* a tramei terminale, filamente de tropomiozină se atașează la suprafața fasciculelor de actină, formînd un complex similar complexului polipeptida de 110 k-daltoni-calmodulina de la suprafața miezului microvililor. De asemenea, o țesătură de proteine filamentoase, neactinice, leagă între ele rădăcinile miezurilor adiacente. Aceste proteine de legătură sînt: miozina și proteine asemănătoare cu spectrina (așa-numitele proteine TW 260/240).

Complexul joncțional cuprinde un aparat citoscheletal asociat, situat la marginea tramei terminale. Complexul joncțional se formează prin asocierea

Scanned with OKEN Scanner

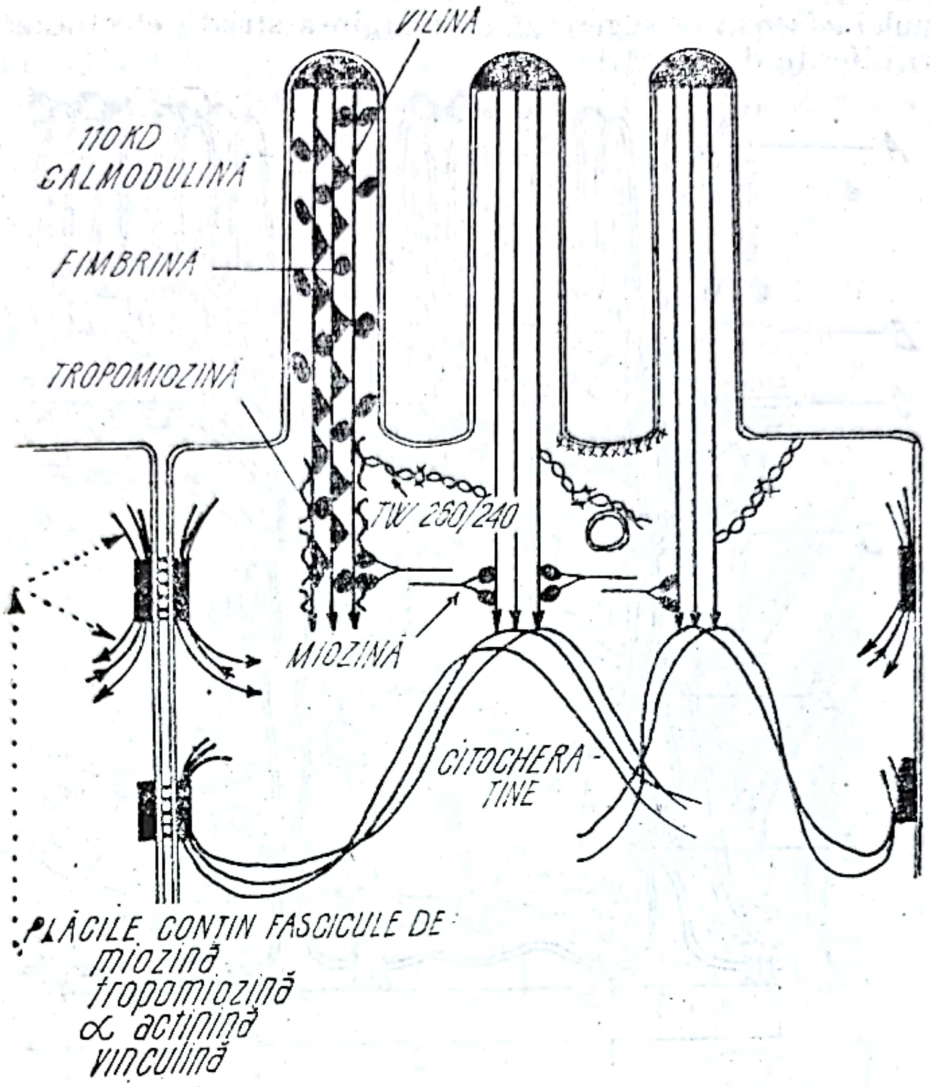


Fig. 4.43. — Ultrastructura microvililor.

următoarelor tipuri de joncțiuni: *zonula occludens*, *zonula adherens*, *macula adherens*. *Zonula adherens* este asociată cu fascicule de actină dispuse circumferențial. Aceste filamente de actină sînt sudate pe fața citoplasmatică a membranei, prin intermediul unei plăci dense în formă de panglică (fig. 4.44). Placa densă conține vinculina și alfa-actinina, proteine care se leagă de actină. De asemenea, la acest nivel se mai află fascicule de miozină, filamină și troponină. În sfîrșit, pe placa densă se ancorează fascicule de citokeratine care se extind la baza tramei terminale, stabilind contacte directe cu rădăcinile miezului.

Funcția certă a miezului microvililor este aceea de a menține forma cilindrică a membranei microvilului. În acest scop vilina și Ca^{2+} controlează asamblarea și dezasamblarea citoscheletului miezului. La o concentrație de Ca^{2+} sub M^{-6} citoscheletul miezului este o structură stabilă și rigidă; peste acest prag, filamentele miezului se dezagregă.

Complexul calmodulină-proteina de 110 k-daltoni ar putea fi implicat în tamponarea Ca^{2+}, în transportul vitaminei D sau/și în transportul veziculelor acoperite.

Scanned with OKEN Scanner

Cele două zone de distribuție a miozinei — zona dintre rădăcini și la nivelul zonulei *adherens* — sugerează că marginea striată efectuează cel puțin două tipuri diferite de mișcări.

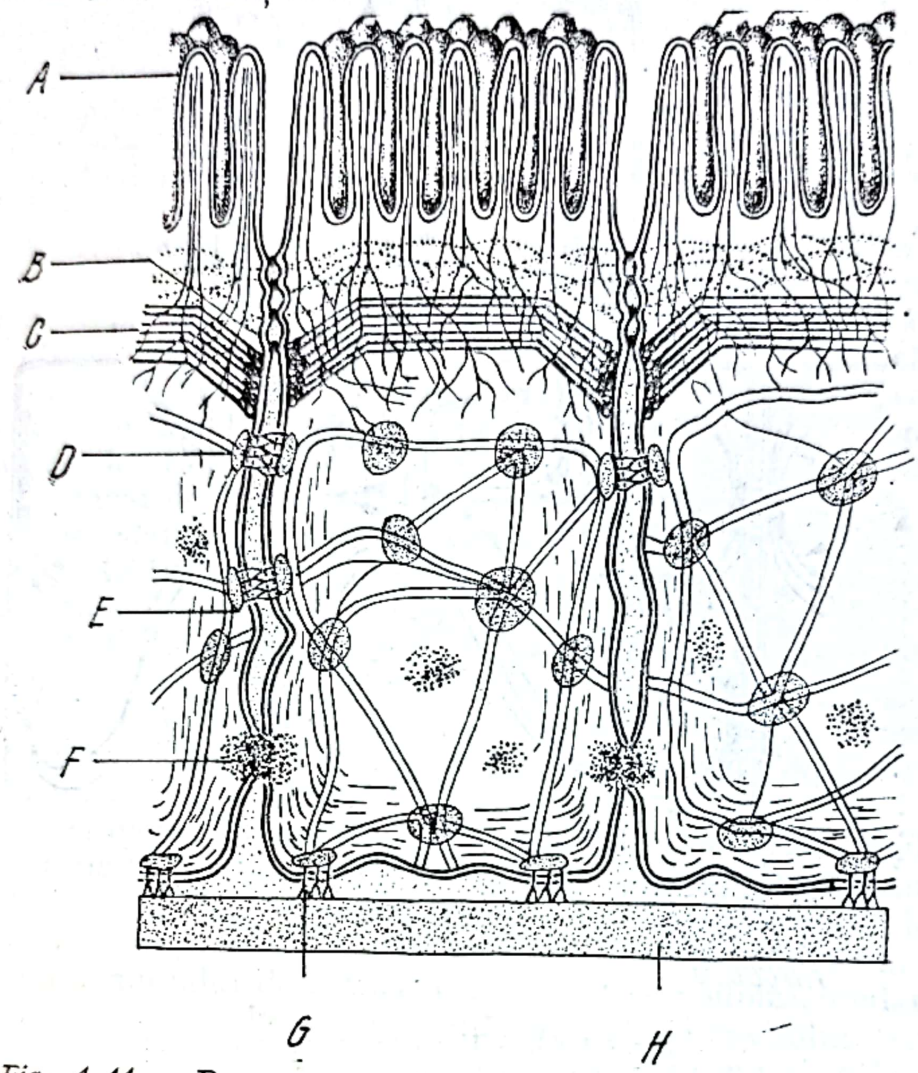


Fig. 4.44. — Reprezentare schematică a distribuției diferitelor tipuri de joncțiuni între celulele epiteliale ale intestinului subțire: *A* — microvili; *B* — joncțiune strînsă; *C* — desmozomi în bandă; *D* — desmozomi în pată; *E* — filamente de keratină; *F* — joncțiunea *gap*: *G* — hemidesmozomi; *H* — membrana bazală.

4.4.3.4.1.3. *Marginea în perie.* La nivelul tubului contort proximal al nefronului, membrana apicală a celulelor prezintă microvili care la microscopul optic au aspectul firelor dintr-o perie. Și aici, acest dispozitiv de microvili are drept scop mărirea suprafeței de contact a polului apical cu fluidul (urina primară) din lumenul tubular. Deoarece microvilii din nefrocite sînt consacrați în principal transportului de lichide, ei nu suferă presiuni osmotice așa de mari ca microvilii digestivi. Formațiunile microvilare din rinichi sînt mai lungi decît cele din intestin. În plus, ei au un citoschelet axial mai puțin dezvoltat, ceea ce permite variația lungimii lor.

4.4.3.4.1.4. *Stereocilii.* Stereocilii sînt microvili foarte lungi și uneori ramificați. La microscopul optic ei par asemănători cu cilii, dar, spre deosebire de aceștia, sînt lipsiți de mobilitate datorită absenței aparatului microtubular caracteristic cililor. Stereocilii se găsesc la polul apical al celulelor epiteliale din epididim și canalul deferent.

Scanned with OKEN Scanner

4.4.3.4.1.5. *Cilii*. Organele în lumenul cărora are loc transportul unor particule sau al unor celule, cum sînt căile respiratorii, oviductul sau ureterul, sînt căptușite de celule epiteliale, care prezintă la polul apical structuri speciale denumite cili (fig. 4.45). Centrul fiecărui cil constă din două perechi

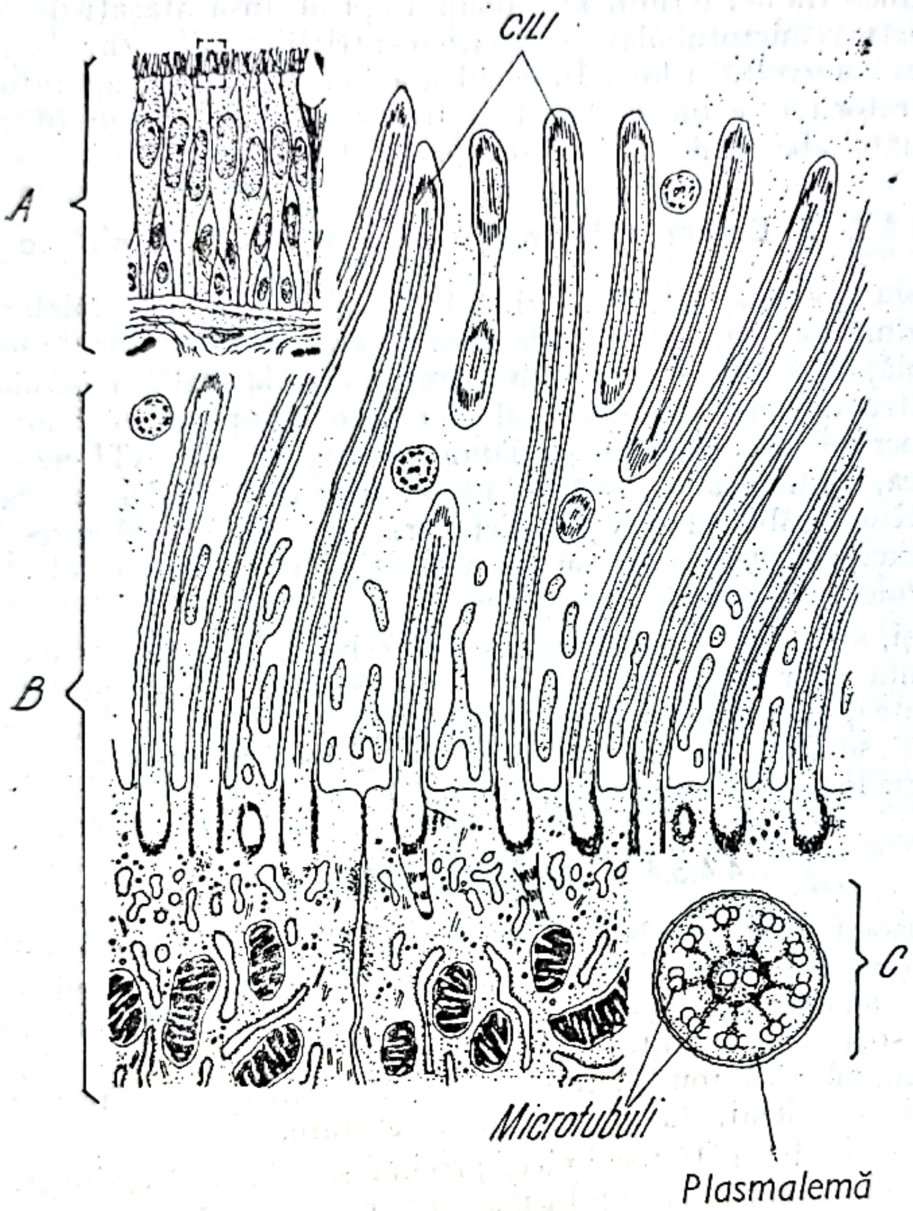


Fig. 4.45. — Schema aspectului la microscopul optic și la microscopul electronic al epiteliului pseudostratificat cilindric ciliat. *A* — schema imaginii la microscopul optic; *B* — schema ultrastructurii polului apical al celulelor ciliate; *C* — schema aspectului ultrastructural al cilului în secțiune transversală.

centrale și nouă perechi periferice de microtubuli care sînt alcătuiți din subunități proteice, denumite alfa-și beta-tubuline. Unul dintre tubulii perechilor periferice prezintă brațe transversale alcătuite din dineină, o proteină cu activitate ATP-azică. Prin intermediul mecanismului de transformare a energiei chimice în energie mecanică (similar interacțiunii actină-miozină din mușchi), care implică stabilirea reversibilă de legături transversale între microtubuli, energia fiind furnizată prin intermediul activității ATP-azice a dinei-

nei, cilii efectuează o serie de mișcări caracteristice de pendulare. Deoarece mișcările cililor de la suprafața epiteliului sînt coordonate, ei se mișcă „în val" și astfel facilitează deplasarea mucusului sau fluidelor, împreună cu particulele conținute în ele, la suprafața epiteliilor. Ca și microvilii, cilii sînt ancorați în regiunea tramei terminale a polului apical, însă atașați de *corpusculii bazali* (structuri microtubulare similare centriolilor, din care s-au format cilii, în cursul dezvoltării lor). În cazul unor boli genetice, aparatul ciliar al căilor respiratorii este incomplet dezvoltat și aceasta are drept consecință instalarea unor afecțiuni cronice ale aparatului respirator.

4.4.3.4.2. Domeniul latero-bazal al membranei celulare

Membrana celulară de pe fețele laterală și bazală ale celulelor epiteliale conține enzime esențiale pentru transportul transepitelial. Trebuie remarcat că, de regulă, aceste enzime sînt similare pe fața laterală și bazală. Enzima *marker* pentru domeniul latero-bazal al enterocitelor, nefrocitelor și pentru celulele exocrine din pancreas și glandele salivare, este ATP-aza de Na/K. De asemenea, membrana latero-bazală a celulelor din glandele salivare conține canale de K activabile direct prin depolarizarea membranelor respective (ca urmare a excitației nervoase) sau prin creșterea Ca^{2+} intracelular, sau indirect prin colecistokinină și acetilcolină.

Totuși, sectorul lateral al membranei celulare se deosebește de cel bazal prin prezența unor dispozitive joncționale specifice. Astfel, pe fețele laterale sînt prezente joncțiunile strînse, desmozomii și joncțiuni de tip *gap*, iar pe fața bazală se află hemidesmozomi, prin intermediul cărora celulele aderă la membranele bazale.

4.4.3.4.3. Polaritatea hepatocitelor

Hepatocitul este o celulă epitelială polarizată, a cărui membrană plasmatică este însă diferențiată în *trei* domenii distincte morfologic și fiziologic, și anume: domeniul *sinusoidal*, domeniul *lateral* și domeniul *canaliculului biliar*. Acestea sînt delimitate morfologic prin *zonulae occludentes*, evidențiabile pe imaginile electronomicroscopice de transmisie, ca și prin microscopia electronică de baleiaj, după congelare-fracturare.

Cercetările imunohistochimice, precum și cele de fracționare celulară, au dus la concluzia că domeniul *canaliculelor biliare* este caracterizat de prezența leucilaminopeptidazei, fosfatazei alcaline, 5'-nucleotidazei, precum și a trei glicoproteine (de 105, 110 și 160 k-daltoni).

4.4.3.4.3.1. *Domeniul sinusoidal (perisinusoidal)* asigură schimbul dintre hepatocit și sîngele din capilarul sinusoid hepatic. Acest domeniu al membranei plasmatice conține receptori care facilitează aceste schimburi ca: receptori specifici pentru insulină, pentru asialoglicoproteine și pentru monozo-6-fosfat, precum și pentru alți hormoni ca și pentru moleculele din sînge cu greutate moleculară mare sau mică.

4.4.3.4.3.2. *Domeniul lateral* al membranei plasmatice conține diferite proteine sau „canale" proteice care facilitează schimburile interhepatocitare. Așa sînt ATP-aza pentru Na^+ și K^+ și adenilatciclaza (această enzimă se află și la nivelul domeniului sinusoidal).

Scanned with OKEN Scanner

Pe cale imunocitochimică s-a putut stabili că *heparan-sulfat proteoglicanii* se află în strînsă asociație cu membrana plasmatică și cu endomembranele hepatocitelor; în acest sens s-a demonstrat că: *a)* ei sînt în cea mai mare măsură concentrați la nivelul domeniului sinusoidal la plasmalemei celulei respective; *b)* sînt absenți sau se găsesc în concentrație foarte mică la nivelul domeniilor laterale sau al canaliculelor biliare; *c)* nu se limitează la prezența la nivelul plasmalemei, ci se găsesc și în compartimentul intrahepatocitar. De ce heparan-sulfații sînt concentrați la polul vascular, nu este pe deplin clar. Studii anterioare au arătat că heparan sulfații concentrați pe suprafața celulelor endoteliale, care, ca și suprafața sinusoidală a hepatocitelor este expusă plasmei sanguine, sînt capabili să lege molecula din sîngele circulant ca lipoprotein-lipaza și antitrombina. S-a sugerat de asemenea că heparina joacă un rol în modularea reacției dintre lipoproteinele cu greutate moleculară joasă și receptorii acestora de pe suprafața celulelor. Trebuie precizat aici că heparan sulfații de pe suprafața hepatocitelor sînt *asemănători* cu cei de pe membranele altor celulele ca nefrocitele, celulele endoteliale sau fibroblastele și *antigenic diferiți de heparan sulfații din membranele bazale.*

Heparan sulfații identificați în cisternele Golgi și în reticulul endoplasmic hepatocitar reprezintă foarte probabil *pool* *-ul de heparan sulfați destinați suprafeței celulare; aceștia sînt nou-sintetizați, ca glicoproteine în R.E., și apoi transferați în aparatul Golgi pentru glicolizare și sulfatare. Heparan sulfații din endozomi și din lizozomi ar putea fi destinați fie degradării, fie sînt în tranzit pentru reciclare.

4.4.3.4.3.3. *Polaritatea intracelulară.* În numeroase tipuri de celule epiteliale și în mod special în celulele secretorii, polaritatea celulară este reflectată atît prin caracterele membranei plasmatice cît și prin distribuția organitelor intracelulare. De exemplu, în celulele glandulare reticulul endoplasmic rugos se află de obicei la polul bazal, aparatul Golgi deasupra nucleului, iar veziculele secretorii în vecinătatea polului apical. Această distribuție a organitelor reflectă de fapt, fluxul desfășurării proceselor secretorii, care încep la nivelul ribozomilor atașați (la polul bazal), se continuă în aparatul Golgi (în zona supranucleară) și se desăvîrșesc în veziculele de condensare și de secreție de la polul apical.

Și distribuția mitocondriilor reflectă funcția celulelor epiteliale: în enterocite mitocondriile sînt la polul apical, în nefrocite la polul bazal etc.

Polaritatea intracelulară este controlată de *centrul celular.* Zona densă de citoplasmă de la periferia centrului celular constituie centrul formator al microtubulilor, care orientează deplasarea intracelulară a diferitelor organite și alte mișcări celulare. *Centriolii* acționează ca *organizatori dominanți* care determină poziția precisă a zonei dense pericentriolare și, prin aceasta, polaritatea generală a celulei. În consecință, centrul celular este plasat de regulă între nucleu și polul apical.

4.4.4. CITOPLASMA CELULELOR EPITELIALE

Organitele celulelor epiteliale nu prezintă deosebiri calitative (nici față de alte tipuri de țesuturi, nici de la o celulă epitelială la alta), ci doar variații

---

* *Pool* (engl).—fond, rezervă.

Distribuția polipeptidelor keratiniene majore în diferite celule

Nr.	1	2	3	4	5	6
Greutatea moleculară ($\times 10^{-3}$)	6,8	65,5	63	59	58	56
pH izoelectric	7,8	7,8	7,5	7,3	7,4	7,8
A. *Epitelii normale*						
Epiderm (diferite regiuni)	+	(+)			+	
Epiderm din talpa piciorului	+	(+)			+	+
Epidermul canalului anal	+	(+)			+	+
Foliculul pilos					+	+
Glandă sebacee				+	+	+
Corneea			+		+	
Exocervix	+	(+)		+	+	+
Epiteliul amigdalian				+	+	+
Epiteliul epiglotei				+	+	+
Epiteliul esofagian				+	+	(+)
Glanda apocrină axilară				+	+	
Glanda exocrină sudoripară				+	+	
Canal glandular mamar					+	
Epiteliul traheal					+	(+)
Epiteliul amniotic					+	+
Epiteliul vezicii urinare					(+)	
Epiteliul veziculei biliare						
Epiteliul intestinului subțire						
Epiteliul colonului						
Hepatocite						
B. *Tumori*						
Carcinom hepatocelular						
Adenocarcinom de colon tip I						
Adenocarcinom de colon tip II						
Adenocarcinom de stomac						
Adenocarcinom de esofag						
Adenocarcinom de pancreas						
Carcinom de sîn tip I						
Epiteliom bazocelular					+	(+)
Carcinom scuamos din piele					+	+
Carcinom scuamos din amigdală					+	+
Carcinom ductal de sîn tip II						+
Carcinom de bronhii nediferențiat						+
Carcinom de sinus maxilar					+	
Adamantinom				+	+	
Carcinom scuamos de epiglotă				+	+	+
Carcinom scuamos de esofag				(+)		+
Carcinom scuamos recto-anal				(+)	+	+
Carcinom cloacogen					+	(+)

\+ Semnifică identificarea componentei respective în cantitate apreciabilă
(+) Semnifică prezența în cantitate mică a componentei respective

Scanned with OKEN Scanner

epiteliale normale și canceroase*

7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
54	52,5	64	56,5	56	55	54	50	50	48	46	45	40
6,0	6,1	5,4	5,3	5,3	4,9	5,1	5,3	4,9	5,1	5,1	5,7	5,2
		+	+ + + (+)	+ + + (+)	+	+ + + +	(+) + + + (+)	+ (+) (+) + (+)	(+) +	(+) + (+)		(+) (+) (+) (+)
+ + + (+)	+ + + + +					(+) + +	+ + + (+) (+)	+ (+) +		(+) (+) + + +	(+) (+) (+) (+) (+)	+ + + + +
+ +	+ + + + +					(+)					(+) + + + +	+ + + +
(+) + (+)	+ + + + + + +									(+) (+)	+ + + + + + +	+ + + + + + +
	+		+				+ + +	(+)	+	+ (+) +		
+ +	+ + +		(+)	(+)			(+)		(+) +	(+) + +	+ + +	+ + +
+	+ (+) (+) (+) +		(+) (+)	(+) (+)		+	+ + + + (+)	(+) (+) (+) (+) +	+ (+) (+) +	+ + + + +	(+) (+)	+ + + + +

cantitative și topografice, care vor fi evocate la fiecare tip de țesut epitelial în parte. În schimb, *matricea celulară (hialoplasma; citoplasma fundamentală)* prezintă unele particularități calitative caracteristice pentru țesuturile epiteliale, constînd din prezența unor molecule organice specifice țesuturilor epiteliale. Cu toate că numărul tipurilor de proteine din matricea citoplasmatică variază foarte mult de la o specie de celulă la alta (exemplu: citoplasma ovocitului de *Xenopus* posedă circa 100 de proteine, iar în citoplasma hepatocitului există circa 1 350 de tipuri diferite de proteine), majoritatea masei proteinelor, în toate speciile de celule, este reprezentată de șase tipuri de proteine, și anume: *actină*, *alfa-* și *beta-tubuline*, proteinele *filamentelor intermediare*, *clatrina* (proteina veziculelor acoperite), *spasmina* (o proteină care se contractă în prezența Ca^{2+}) și *calmodulina* (o proteină cu afinitate pentru calciu). Proteinele majoritare vor alcătui citoscheletul matricei, care cuprinde o *rețea principală*, constituită din grupe de filamente de actină, microtubuli și/sau din filamente intermediare și o *rețea microtrabeculară* de legătură între ochiurile *rețelei principale*.

Filamentele intermediare ca vimentina, desmina și gliofilamentele sînt alcătuite dintr-un singur tip de subunități proteice. Mai mult, vimentina poate coexista în aceleași celule cu alte filamente intermediare, de exemplu desmina, în cazul celulelor musculare netede ale mediei vaselor sanguine. Spre deosebire de acestea, *filamentele de citokeratine*, care sînt alcătuite din proteine asemănătoare (dar nu identice) cu alfa-keratinele epidermice, formează o *familie complexă care cuprinde mai multe polipeptide diferite*. Aceste citokeratine, care prezintă asemănări biochimice și imunologice de diferite grade, se prezintă în diferite celule epiteliale, sub diferite combinații, cu valoarea pH-ului izoelectric variind de la 5 la 8 și cu greutatea moleculară între 40 000 și 68 000 daltoni. Un anumit tip de celulă epitelială poate fi caracterizat printr-o asociație specifică a citokeratinelor din interiorul citoplasmei.

Filamentele intermediare din citoscheletul extras din țesuturile epiteliale reacționează specific cu anticorpii anti-alfa-keratină epidermică și au fost denumite citokeratine. Ei pot reconstitui filamente *in vitro* din monomerii denaturați. *Studiul extractelor din diferite epitelii umane a permis identificarea diferitelor caracteristici ale polipeptidelor cito-keratiniene, pentru fiecare tip de celule epiteliale în parte* (tabelul 4.IV).

Tipurile de citokeratine umane identificate pînă în prezent sînt definite prin: *număr de ordine*, *greutate moleculară relativă* și *valoarea pH-ului izoelectric*.

Se pot trage următoarele concluzii privitoare la citokeratinele din diferite epitelii umane:

a) în cursul diferențierii, în diferite celule epiteliale din organism se formează citokeratine specifice pentru fiecare tip epitelial în parte. Acest fapt dovedește că citokeratinele sînt o familie de polipeptide multigenă, al căror substrat genetic se exprimă diferit în cursul diferitelor căi de diferențiere epiteliale. Fenotipul keratinian specific pentru fiecare tip de țesut epitelial se constituie, în linii generale, începînd din cea de a 16-a săptămînă a dezvoltării embrionului uman;

b) pînă în prezent, au fost identificate 19 tipuri diferite de polipeptide keratiniene, în diferite tipuri de celule epiteliale de acoperire sau glandulare din corpul uman. Cu toate că mai există cîteva tipuri de țesuturi epiteliale încă neexplorate, se apreciază că totalitatea tipurilor de citokeratine probabil prezente în epiteliile umane nu va depăși cu mult cifra 20;

Scanned with OKEN Scanner

c) celulele epiteliale pot fi clasificate după tipul de keratină pe care-l conțin. De exemplu, epiteliul simplu din tubul digestiv subdiafragmatic și epiteliile glandelor digestive anexe (ficatul, pancreasul) sînt caracterizate printr-o compoziție foarte simplă a citokeratinelor, cuprinzînd numai două sau patru tipuri de polipeptide majore. Acestea includ, de regulă, componentele 8 și 18 (cea din urmă este și prima citokeratină care apare în cursul embriogenezei) și nu conțin niciodată citokeratinele neutre și bazice. Epiteliul traheal și numeroase glande exocrine conțin atît citokeratine bazice (numărul 4—6) cît și polipeptidele 7, 8, 14, 18 și 19 (vezi tabelul 4.IV). Epidermul, ca și restul țesuturilor pluristratificate de tip pavimentos, prezintă mai multe tipuri de citokeratine acide și bazice, printre care polipeptidele 1—10 și 11 apar în faza terminală a diferențierii keratiniene. Cele 7 tipuri de celule din epiderm (inclusiv din foliculul pilos și glandele sudoripare și sebacee) conțin 10 tipuri diferite de citokeratine. Glandele exocrine care sînt alcătuite din diferite tipuri de celule (celule secretorii, celule ductale și celule mioepiteliale), conțin polipeptide keratiniene diferite pentru fiecare tip de celulă în parte (exemplu: glanda mamară).

Trebuie notat că citokeratinele nr. 4—6 și 14 sînt prezente atît în epiteliile pluristratificate (cum este epidermul), cît și unele epitelii nestratificate în condiții normale, dar care pot deveni pluristratificate prin metaplazie, în condiții patologice. În această ultimă categorie intră epiteliul traheal și bronșic, epiteliul glandei prostatei, precum și epiteliul canalelor galactofore din glanda mamară;

d) în ultimii ani s-au făcut progrese semnificative în identificarea tipurilor și a proprietăților citokeratinelor epiteliului amniotic. Interesul pentru această problemă este nu numai teoretic general, ci și practic, dată fiind importanța amniocentezei în diagnosticul prenatal.

Pe această linie este de reținut mai întîi că epiteliul amniotic nu este omogen în privința compoziției filamentelor intermediare, deoarece pe lîngă citokeratine, unele celule epiteliale amniotice conțin și vimentină. Sinteza simultană a citokeratinelor și a vimentinei se întîlnește în mod excepțional în țesuturile epiteliale normale, fiind însă un fenomen obișnuit la celulele cultivate *in vitro*, precum și în diferitele tipuri de carcinoame.

De asemenea, se poate face observația că citokeratinele epiteliului amniotic se dovedesc a fi deosebit de stabile și în culturile *in vitro*, conservîndu-și caracterele și după mai multe luni de menținere *in vitro*.

De notat că fluidul amniotic (recoltat în urma paracentezei) *nu* conține o populație de celule omogene ca origine. Celulele derivate din epiteliul amniotic sînt o mică fracțiune. În compoziția lichidului amniotic mai intră și celule epiteliale provenite din uroteliu, din tractul bronhopulmonar, precum și din canalele colectoare renale.

În consecință, se poate conchide că celulele proliferative obținute în urma cultivării *in vitro* a lichidului amniotic, *nu provin din fracțiunea de celule ale epiteliului amniotic* ci din celelalte fracțiuni epiteliale și *îndeosebi din fracțiunea urotelială*. Această concluzie are o importanță practică deosebită în diagnosticul prenatal și, în mod particular, în evaluarea cariotipurilor care reprezintă heterogenități (ca mozaicismul sau pseudomozaicismul);

e) analiza biochimică a citoscheletului carcinoamelor umane arată că tumorile derivate din diferite tipuri de epitelii prezintă, de asemenea, cito-

keratine caracteristice. Caracteristicile citokeratinelor unui tip de tumoare dat se dovedesc a fi identice în tumorile primare și în metastaze, indiferent de localizarea și mărimea metastazei. În general, tumorile derivate din epitelii par să păstreze caracterul majorității polipeptidelor citokeratiniene tipice pentru celulele netransformate malign. În unele cazuri, ca de pildă în adenocarcinoamele tubului digestiv și în hepatocarcinom, citokeratinele din carcinom sînt identice cu cele ale tipului de celule de origine. Această tendință de păstrare a tipului de polipeptide keratiniene în cursul transformării maligne, va servi ca bază pentru o nouă caracterizare a tumorilor, după tipul de citokeratină, ceea ce va contribui la ameliorarea diagnosticului și clasificării tumorilor, în special în cazul metastazelor nediferențiate;

f) examenul electronomicroscopic amănunțit permite recunoașterea, în citoplasma celulelor epiteliale, a *două forme distincte de organizare a microfilamentelor intermediare:* sub formă de *fascicule* și sub formă de *rețea laxă*. Fasciculele de microfilamente intermediare sînt prezente mai frecvent la periferia celulelor epiteliale, alcătuind așa-numitele *tonofilamente*. Acestea dau reacții imunofluorescente încrucișate cu prekeratinele extrase din epiderm și de aceea mai sînt denumite și citokeratine. Topografia intracelulară a citokeratinelor nu este influențată de colchicină sau de substanțe similare, fapt ce demonstrează că acest tip de filamente intermediare nu se asociază cu microtubulii în efectuarea mișcărilor intracelulare. Citokeratinele sînt foarte probabil implicate în menținerea formei celulei epiteliale.

Filamentele intermediare prezente în celulele epiteliale sub formă de rețea laxă, sînt constituite din *vimentină* (greutate moleculară 55 000), deoarece dau reacții imunologice pozitive pentru vimentină. Ele se agregă perinuclear sub acțiunea colchicinei. Redistribuirea acestor microfilamente și acumularea lor juxtanucleară în absența microtubulilor (ca urmare a tratamentului cu colchicină) arată că ele sînt dependente de microtubuli. Acest fapt sugerează că microfilamentele de vimentină, împreună cu microtubulii, sînt implicate în deplasarea organitelor intracelulare.

Cel mai greu de explicat este de ce microfilamentele intermediare din diferitele celule epiteliale sînt atît de diverse, atît în ceea ce privește *tipul* (coexistența în aceeași celulă a citokeratinelor și vimentinei), cît și greutatea moleculară (prezența unei familii largi de citokeratine). Trebuie reținut totuși că filamentele intermediare nu se observă în filogenie, așa ca în cazul celorlalte două componente majore citoscheletale — microtubulii și actina —, ci ele sînt substratul unui complicat proces de diferențiere celulară.

4.5. BIOLOGIA GENERALĂ A EPITELIILOR

Țesuturile epiteliale sînt așezate pe un strat de țesut conjunctiv numit *lamina propria*, de care sînt legate prin intermediul membranei bazale. *Lamina propria* servește ca suport pentru țesutul epitelial respectiv și constituie o cale de legătură cu țesuturile învecinate. În cazul diferitelor tipuri de glande, *lamina propria* este reprezentată de capsula și septurile conjunctive ale glandei respective.

Scanned with OKEN Scanner

4.5.1. NUTRIȚIA ȘI INERVAȚIA

În mod normal, vasele sanguine nu pătrund în epitelii, așa încît ele nu au contacte directe cu celulele epiteliale. În consecință, hrănirea epiteliilor depinde de difuziunea substanțelor trofice prin membrana bazală și prin matricea țesutului conjunctiv din *lamina propria*.

Țesuturile epiteliale primesc numeroase terminații nervoase din sistemul nervos periferic.

4.5.2. REÎNNOIREA CELULELOR EPITELIALE

Țesuturile epiteliale sînt structuri labile (conțin populații de celule tranzitorii) ale căror celule sînt reînnoite continuu prin activitatea mitotică. Rata de reînnoire este variabilă. Ea poate fi rapidă, ca în epiteliul intestinal, care se reînnoiește la 2—5 zile, sau lentă, ca în pancreas, ale cărui celule au o rată de reînnoire de cca 50 de zile. În epiteliile stratificate, celulele de origine se află în stratul bazal, în vecinătatea membranei bazale, unde se produc mitozele.

4.5.3. METAPLAZIA

În anumite condiții fiziologice și patologice, un anumit tip de țesut epitelial poate să se transforme în alt tip de epiteliu. Acest proces, denumit *metaplazie*, este reversibil. De exemplu, la marii fumători, epiteliul pseudostratificat al arborelui respirator se transformă în epiteliu stratificat pavimentos. De asemenea, la indivizii cu hipovitaminoza A, țesuturile epiteliale din căile respiratorii și respectiv vezica urinară, sînt înlocuite cu epitelii stratificate de tip pavimentos. Metaplazia nu se restrînge la țesuturile epiteliale, ci poate fi întîlnită și la țesuturile conjunctive.

4.5.4. CONTROLUL ACTIVITĂȚII GLANDULARE

Activitatea glandelor depinde de două tipuri de mecanisme. Primul este genetic și depinde de expresia uneia sau mai multor gene care coordonează sinteza și secreția unor compuși specifici. În cursul diferențierii unei celule glandulare au loc selecția și expresia genelor care controlează secreția.

Al doilea mecanism este legat de controlul exogen, exercitat de mediu, și are loc cu participarea sistemului nervos și endocrin. Cele mai multe glande sînt sensibile atît la controlul nervos cît și la cel endocrin, însă, de obicei, unul sau altul este predominant. Astfel, secreția exocrină din pancreas depinde, în principal, de stimularea hormonală prin secretină și colecistokinină (pancreozimină). Pe de altă parte, glandele salivare sînt în principal

Scanned with OKEN Scanner

sub controlul nervos. Controlul nervos și endocrin al glandelor se efectuează prin intermediul unor substanțe chimice denumite *mesageri chimici*. Neurotransmițătorii sînt mesagerii produși de celulele nervoase, iar hormonii sînt factorii de control produși de glandele endocrine.

Mesagerii chimici pot acționa pe două căi diferite. Într-un prim caz, mesagerul pătrunde în celulă, reacționează cu un receptor intracelular și activează una sau mai multe gene, inițiind sinteza de proteine specifice. Această cale de acțiune este urmată de hormonii steroizi care sînt capabili să traverseze ușor membrana lipoproteică. Un antibiotic, dactinomicina, blochează sinteza de ARN-mesager, utilizînd aceeași cale.

Cea de a doua cale este aceea a interacțiunii mesagerului chimic cu un receptor localizat la suprafața membranei celulare. Această substanță chimică, denumită *mesager de ordinul I*, acționează prin inducerea sintezei sau eliberării unui alt mesager, denumit *mesager de ordinul II*, care inițiază o serie de reacții; acestea produc în final o activitate celulară specifică

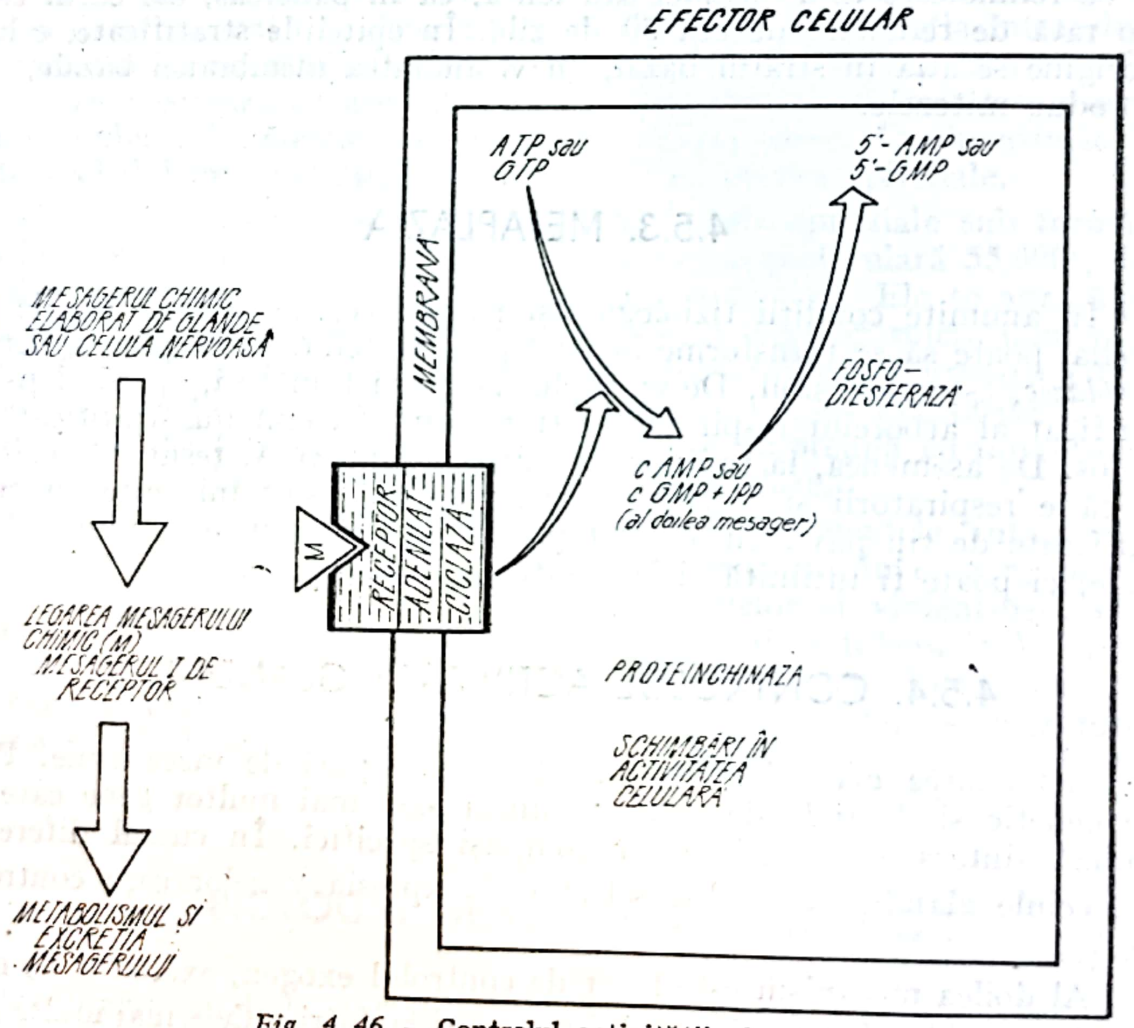


Fig. 4. 46. — Controlul activității glandulare.

(fig. 4.46). Hormonii proteici sau glicoproteici, ca și neurotransmițătorii, care nu pot traversa ușor membrana, acționează asupra celulelor-țintă pe această cale.

Scanned with OKEN Scanner

4.6. BAZELE MOLECULARE ALE BIOLOGIEI UNOR ȚESUTURI EPITELIALE

4.6.1. KERATINOGENEZA

În ultimii ani s-au făcut progrese importante în ceea ce privește elucidarea mecanismelor celulare și moleculare ale keratinizării. Însemnătatea lor depășește interesul special al epidermului, extinzîndu-se asupra biologiei epiteliilor pluristratificate, în general. Epidermul este un model pentru celelalte tipuri de epitelii pluristratificate, cel puțin în două procese biologice fundamentale, și anume: *a)* mecanismul biogenezei și al proliferării și *b)* mecanismul diferențierii.

4.6.1.1. Biogeneza epidermului

După cum s-a arătat mai înainte, populația principală a epidermului este constituită din keratinocite. Epiteliul stratificat scuamos de tip cornos epidermic este un prototip de epiteliu *polarizat*, în care pierderile prin descuamare sînt localizate la suprafață, în timp ce procesele proliferative se desfășoară exclusiv la nivelul stratului bazal. Între aceste două straturi, celulele nu se mai divid și parcurg un proces de diferențiere caracteristic. În consecință, keratinocitele sînt o populație de *celule tranzitorii*, al căror ciclu vital este limitat în timp, fiind supuse unui continuu proces de reînnoire. Timpul necesar keratinocitelor umane să parcurgă procesul de diferențiere între stratul generator și cel descuamant este de 2—4 săptămîni.

În stratul *bazal* epidermic se află aproximativ 15 000 de celule pe fiecare mm². O mică fracțiune din acestea (circa 10%) este reprezentată de celule speciale ca: celulele pigmentare, celulele Langerhans și celulele Merkel. Majoritatea stratului generator este formată din keratinocite de formă ușor columnară, cu citoplasma bazofilă, care se află în diviziune celulară, fără alte caractere microscopice sau ultramicroscopice speciale. Cu toate acestea, din punct de vedere al însușirilor biologice, keratinocitele stratului bazal nu sînt omogene. O mică parte dintre ele sînt celule *stem*, cu o mare capacitate de automenținere prin diviziune, în cursul întregii vieți a organismului, în ciuda pierderilor prin diferențiere a unei părți. Celulele stem epidermice reprezintă circa 0,60% din celulele stratului bazal. Cea mai mare parte din celulele stratului bazal sînt *celule proliferative* sau *precursoare*, care au căpătat capacitatea de a se diferenția, adică de a evolua pe linia keratinocitară. Acestea provin din diviziunea celulelor stem. Una din celulele-fiice rezultată din diviziunea celulei stem păstrează caracterul matern iar cea de a doua trece în compartimentul proliferativ, angajîndu-se în procesul de diferențiere. Atîta timp cît rămîn în stratul bazal, keratinocitele precursoare (angajate în diferențierea keratinocitară) își păstrează și capacitatea de înmulțire (de aceea sînt denumite proliferative) și ele constituie principala sursă de înlocuire a keratinocitelor uzate (ciclul de diviziune al celulelor stem este mai lent). După cîteva diviziuni în stratul bazal, celulele precursoare trec în compartimentul funcțional care începe cu stratul superior *(stratul spinos)* și aceasta este marcată de achiziționarea unor caractere

Scanned with OKEN Scanner

specifice keratinocitelor. Trecerea celulelor precursoare din stratul bazal în stratul spinos este marcată de apariția unei proteine citoplasmatice solubile denumită *involucrină* (lat. *involucrum* = înveliș) (fig. 4.47), precum și

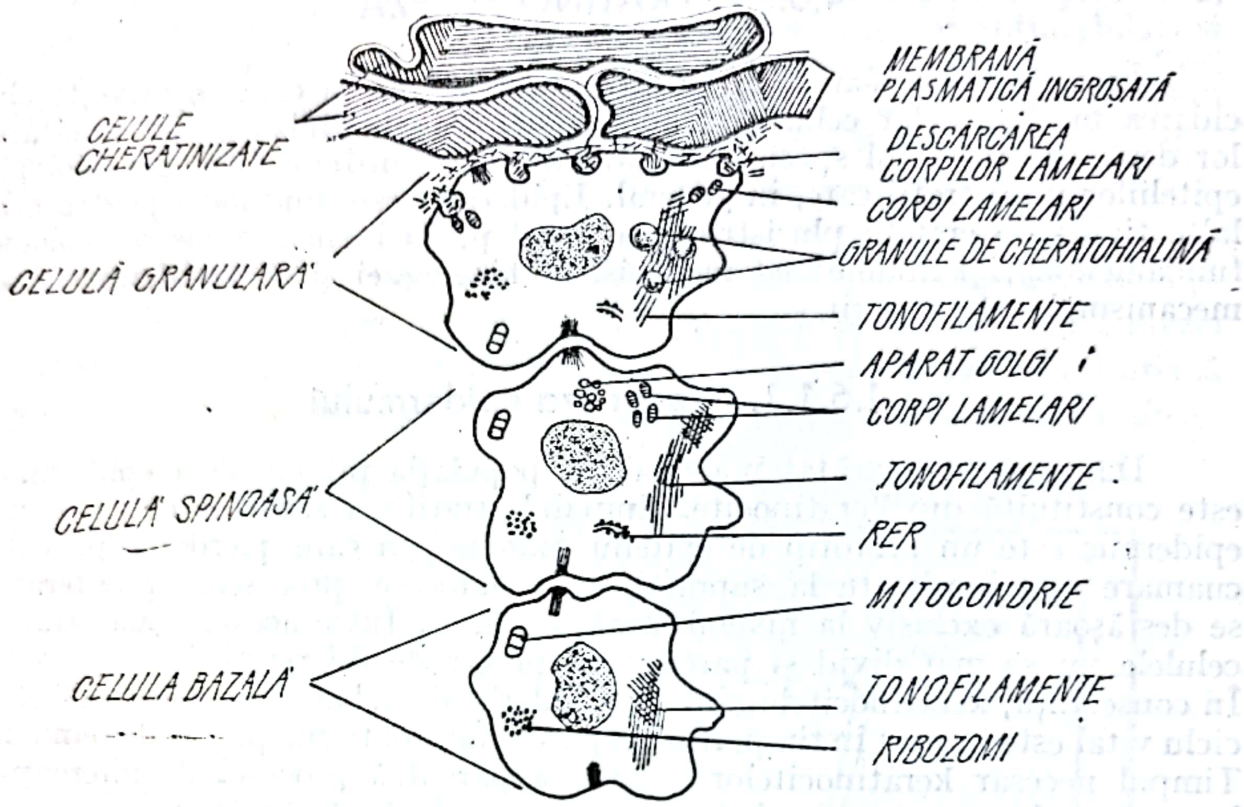


Fig. 4. 47. — Schema keratinocitelor epidermice.

de *suprimarea capacității de diviziune*. Celulele din compartimentul funcțional (spinos, granulos, *lucidum* și cornos) sînt angajate ferm în procesul diferențierii, care se desăvîrșește în stratul cornos, și nu se mai divid, fiind toate descendentele doar a *cîtorva celule stem* și ale unui **pool** *relativ restrîns* de *celule precursoare*, care ocupă un sector limitat din stratul bazal. În consecință, biogeneza celulelor epidermice se efectuează în *unități proliferative epidermice* (UPE) care constituie o familie unitară de celule, compusă din membri cu capacitate proliferativă și membri (compartiment) funcționali. Membrii sau compartimentul proliferativ al familiei sînt localizați în stratul bazal, în timp ce compartimentul funcțional (celulele pe cale de diferențiere) sînt așezate în coloană, deasupra grupului proliferativ. Celulele bazale ale unității proliferative cuprind 10—12 celule dar numai 6—7 sînt celule proliferative propriu-zise (1—2 sînt celule stem, 5—6 — celule precursoare), una este celulă Langerhans și 2—3 sînt celule ce nu se mai divid și așteaptă semnalul să treacă în compartimentul funcțional. Pe fiecare mm^2 de epiderm se află circa 1 400 de unități proliferative epidermice. Celulele stem din stratul bazal prezintă riscul maxim de cancerizare (sub acțiunea unor agenți chimici sau biologici), deoarece ciclul lor biologic este semnificativ mai lent decît al celorlalte celule ale stratului bazal.

Biogeneza epiteliilor pluristratificate ale esofagului, mucoasei bucale etc., se desfășoară în unități proliferative similare celor ale epidermului.

Scanned with OKEN Scanner

4.6.1.2. Diferențierea keratinocitelor

Keratinizarea constă în sinteza și depozitarea intracelulară a *keratinei*, care se constituie pe măsură ce celulele se deplasează din stratul bazal spre stratul superficial, atingînd forma sa completă în stratul cornos, unde umple celulele respective. Acest proces este însoțit de trei tipuri de modificări chimice care au drept consecință: *a)* transformarea matricei celulare în keratină; *b)* densificarea membranei plasmatice și *c)* impermeabilizarea matricei extracelulare.

4.6.1.2.1. Keratina

Keratina este o proteină insolubilă, anionică, foarte rezistentă la digestia enzimatică, cu numeroase legături disulfidice, care dă o difracție în razele X de tip alfa, în mod similar cu miozina și fibrinogenul. Keratina provine din transformările chimice treptate ale *citokeratinelor* (filamentele intermediare ale scheletului celulelor din straturile precedente) și din *keratohialina* stratului granulos. În cursul diferențierii lor, citokeratinele (sau prokeratina) se acumulează treptat în citoplasmă, începînd cu stratul imediat suprabazal, se grupează în forme de fascicule la periferia celulei, pe măsură ce celulele trec în straturile superioare, se sulfatează, iar în stratul granulos superficial se impregnează cu keratohialină. Keratohialina începe să fie sintetizată de ribozomii liberi ai celulelor externe ale stratului spinos și atinge dezvoltarea maximă în stratul granulos. Constituirea alfa-keratinei (prin impregnarea fasciculelor de prekeratină cu keratohialină) se face brusc la trecerea din stratul granulos în cel cornos. Paralel cu constituirea alfa-keratinei în celulele stratului cornos, organitele celulare sînt digerate de enzimele lizozomale (fig. 4.48).

Trecerea bruscă a alfa-keratinei din stratul granulos în stratul cornos se datorează complexării ei cu o proteină bogată în histidină, denumită filagrină.

4.6.1.2.2. Filagrina

Filagrina este o proteină cationică matriceală prezentă *numai* în celulele stratului cornos, funcționînd ca schelet pentru filamentele anionice de alfa-keratină ale celulelor complet diferențiate din stratul cornos. Sinteza filagrinei începe în celulele profunde ale stratului granular sub forma unei proteine precursoare, cu greutate moleculară mare (mai mare de 350 000), bogat fosforilată și de natură anionică, denumită profilagrină. În celulele superficiale ale stratului granulos, profilagrina este fasonată de către o protează care excizează fragmentele fosforilate ale proteinei precursoare, transformînd-o din proteină anionică în proteină *cationică*, nefosforilată și cu greutate moleculară mică, adică în filagrină. Transformarea profilagrinei în filagrină durează circa 6 ore. Profilagrina anionică din stratul granular nu se poate complexa cu alfa-keratina care este tot anionică. Filagrina, în schimb, fiind cationică, se complexează rapid cu alfa-keratina și aceasta explică trecerea bruscă de la bazofilia stratului granular la acidofilia stratului cornos. În stratul cornos filagrina (care, așa cum s-a menționat, reprezintă scheletul pe care se sprijină alfa-keratina) este degradată treptat, treptat

Scanned with OKEN Scanner

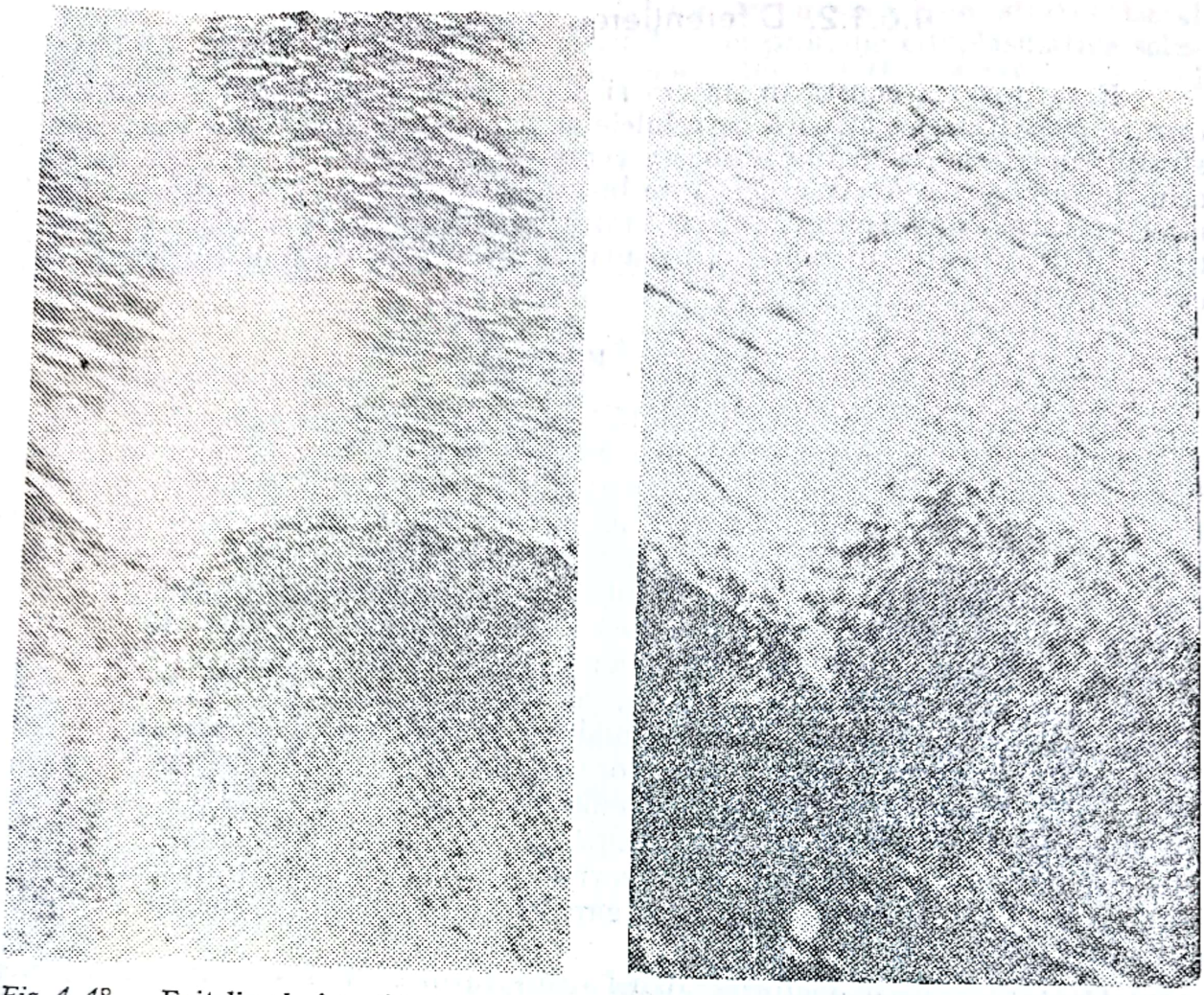


Fig. 4. 48. — Epiteliu pluristratificat pavimentos keratinizat: stînga — piele din regiunea tălpii ×200. Microfotografie-martor la microscopul optic; dreapta — piele din regiunea tălpii×200. Microfotografie la microscopul cu lumină polarizată. Stratul cornos este puternic anizotrop (conține alfa-keratină); stratul spinos este moderat anizotrop (conține citokeratine). Se observă de asemenea anizotropia colagenului din derm.

(în circa 36 ore) în aminoacizi (histidina este convertită în acid urocanic). Rămîne de văzut dacă modelarea proceselor chimice ale keratinogenezei diferă de la un tip de țesut la altul, dacă există variații în procesul de îmbătrînire și ce implicații are în patogenia afecțiunilor epidermice.

Membrana plasmatică a corneocitelor, în fazele terminale ale diferențierii lor, ajunge la o grosime de circa 15 nm, ca urmare a formării unui *înveliș proteic subplasmalemal*. Acest înveliș constă din proteine care devin foarte greu solubile, ca urmare a acțiunii transglutaminazei care introduce legături transversale izopeptidice de tipul gammaglutamil-etalizină între proteine citoplasmatice (de tipul involucrinei) și proteine plasmalemale. Învelișul proteic subplasmalemal devine evident la microscopul electronic încă din stratul granular și se desăvîrșește în stratul cornos. Principala proteină a acestui înveliș este *involucrina*. Involucrina apare ca proteină citoplasmatică solubilă, încă din stratul bazal, în keratinocitele precursoare, care își suspendă activitatea mitotică și se angajează în procesul diferențierii keratinocitare, trecînd în stratul imediat superior. Involucrina solubilă apare

Scanned with OKEN Scanner

în stratul suprabazal al tuturor tipurilor de epitelii pluristratificate, ea fiind un *marker* al constituirii epiteliilor pluristratificate. Transformarea involucrinei în înveliș proteic subplasmalemal are loc numai în epiteliile keratinizate și aceasta se datorează transformării involucrinei solubile în involucrină insolubilă și complexării ei cu alte proteine solubile, precum și cu proteine insolubile, plasmalemale, ca urmare a acțiunii *transglutaminazei*. Transglutaminaza, enzimă activată în stratul granulos de către Ca^{2+}, este utilizată îndeosebi de keratinocitele mature (corneocite) pentru a realiza legături izopeptidice între mai multe tipuri de proteine, unele specifice (involucrina), altele nespecifice, de la nivelul citoplasmei subplasmalemale.

4.6.1.2.3. Matricea extracelulară

Matricea extracelulară din stratul cornos este impermeabilă și conține un material relativ abundent și dens la fluxul de electroni care conferă o adezivitate puternică corneocitelor. Aceasta se datorează, pe de o parte, extinderii și etalării desmozomilor și, pe de altă parte, eliberării în spațiile extracelulare a unui material sintetizat de keratinocite. Keratinocitele din zonele superioare ale stratului spinos și cele din stratul granulos (fig. 4.47) conțin granule rotunde sau ovale, de 100—500 nm, în citoplasma lor periferică. Aceste granule, delimitate de membrane sintetizate în aparatul Golgi, conțin un material de natură glicolipidică, alcătuit din lamele de 2—3,5 nm și sînt denumite *granule lamelare sau keratinozomi*. Conținutul granulelor este eliminat și depozitat în spațiile extracelulare (fig. 4.49). Se presupune că materialul conținut de aceste granule constituie bariera primară pentru apă.

4.6.2. TRANSPORTUL EPITELIAL

Transportul epitelial este un proces fundamental pentru țesuturile epiteliale, constituite din aglomerări celulare nevascularizate. În același timp, el este deosebit de complex și de divers de la un tip de epiteliu la altul. În cele ce urmează vom analiza, pe rînd, *trei cazuri* particulare, și anume: *a)* celulele care transportă *ioni; b) transportul moleculelor exogene complexe* și *c) transportul* intra- și transcelular al *proteinelor secretate de hepatocite*. În capitolul consacrat țesuturilor conjunctive va mai fi descris transportul prin celulele endoteliale. Toate aceste patru cazuri de transport epitelial prezintă interes, deoarece ele constituie modele caracteristice pentru desfășurarea proceselor moleculare ale transportului și în celelalte tipuri de țesuturi epiteliale.

4.6.2.1. Celulele care transportă ioni

Cei mai importanți ioni pentru balanța ionică a organismului sînt *sodiul* și *potasiul*. Celulele organismului uman dispun de mecanisme pentru transportul selectiv al acestor ioni prin membranele celulare. Aceste mecanisme sînt foarte evidente în celulele epiteliale ale nefronului (proximal și distal), precum și în epiteliul ductelor striate ale glandelor salivare. Nefrocitele prezintă următoarele caracteristici: *a)* nucleu situat central; *b)* invaginații numeroase și profunde ale membranei polului bazal celular. Aceste invaginații nu sînt însoțite și de membrana bazală; ele divid polul bazal

Scanned with OKEN Scanner

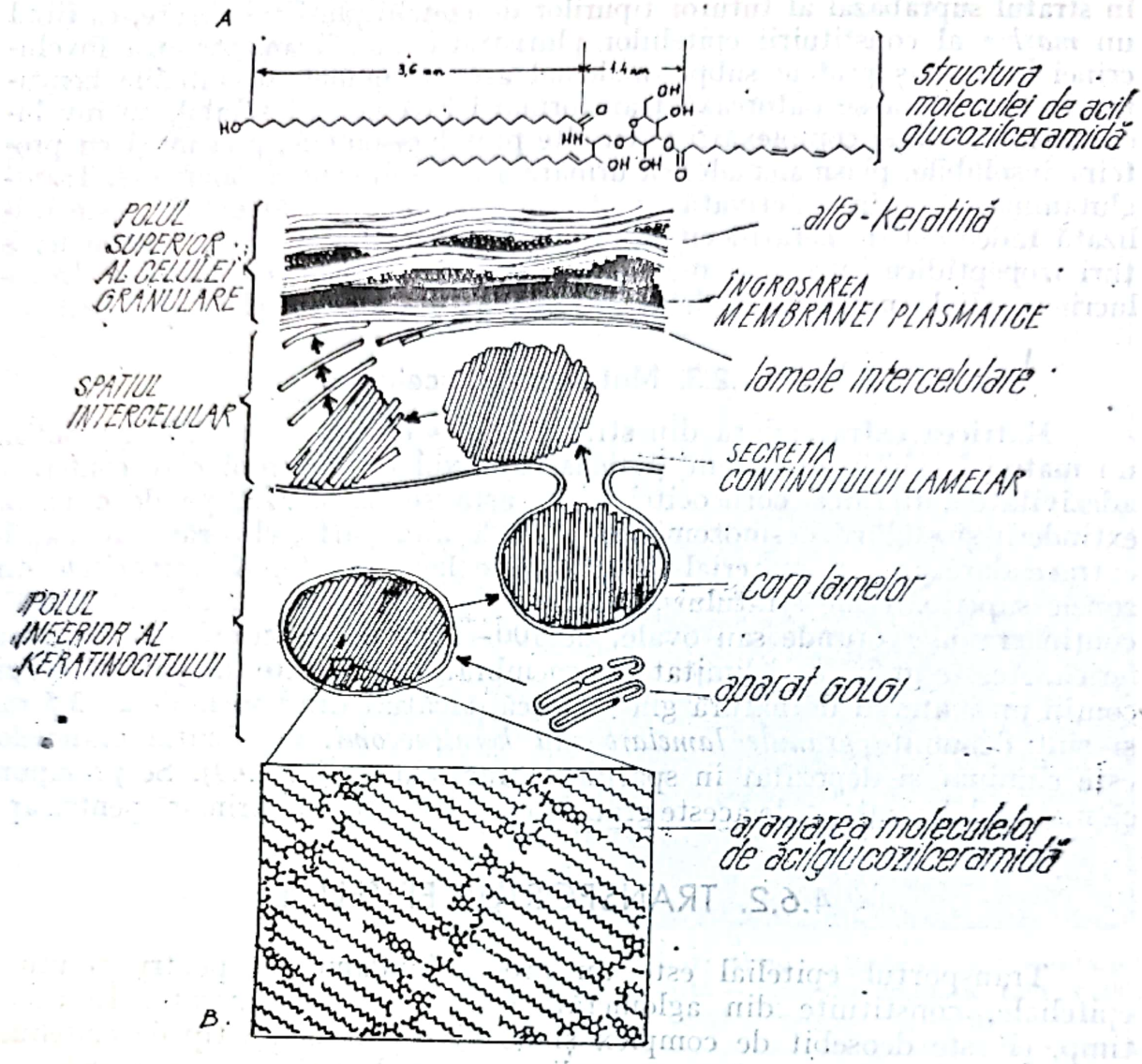


Fig. 4. 49. — Schema secreției glicolipidelor de către celula stratului granular al epidermului.

într-o serie de compartimente verticale, mărindu-i considerabil suprafața; *c)* un mare număr de mitocondrii alungite care umplu spațiul dintre invaginările membranei polului bazal; *d)* activitatea ATP-azică intensă la nivelul membranei polului bazal; *e)* numeroși microvili la polul apical; *f)* frecvente interdigitații ale membranei suprafeței laterale; *g)* o bogată activitate metabolică cu un înalt consum de oxigen.

Studiile efectuate pe aceste celule arată că sodiul reabsorbit la polul apical trece prin mitocondrii (fig. 4.50), iar clorul — prin matricea celulară, pentru a fi transferați prin membrana polului bazal în capilarele sanguine din vecinătatea acestui pol.

Prezența mitocondriilor în spațiul dintre invaginările membranei polului bazal sugerează că aceste organite furnizează energia necesară transferului de ioni prin traversul membranei polului bazal în capilarul sanguin.

Scanned with OKEN Scanner

În diferite tipuri de celule, fluxul transportului ionic poate fi în direcţia pol apical-pol bazal sau în sens invers. În enterocite, nefrocite, ductele striate ale glandelor salivare, în epiteliul vezicii biliare, fluxul este de la polul apical la polul bazal. În alte epitelii, ca plexurile coroide şi procesele ciliare, fluxul se desfăşoară în sens opus (fig. 4.51). În ambele cazuri, joncţiunile *occludens* solidarizează polul apical al celulelor şi delimitează suprafaţa externă de

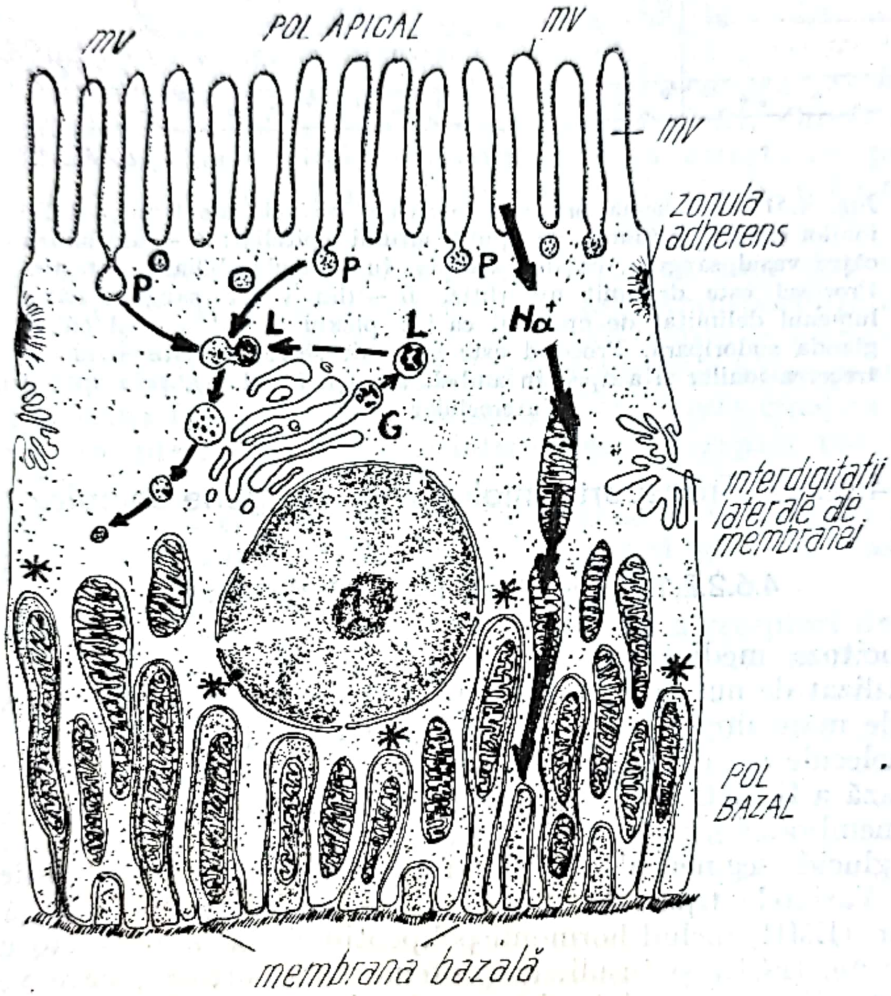


Fig. 4.50. — Schema ultrastructurii nefrocitelor din tubul contort proximal. Invaginările plasmalemei de la polul bazal (*) conţin mitocondrii alungite, dispoziţia lor fiind tipică celulelor care transportă ioni. Proteinele absorbite prin pinocitoză *(P)* la polul apical, unde se găsesc numeroşi microvili *(mv)*, sînt apoi digerate în lizozomi *(L)*, provenind din aparatul Golgi *(G)*. În dreapta schemei, săgeţile groase indică drumul posibil al ionilor de sodiu în celulă. Ionii de Cl^- (nefiguraţi pe schemă) străbat citoplasma prorabil către mitocondrii.

cea internă a epiteliilor. Probabil că fluidul este transportat mai frecvent prin spaţiul extracelular decît transcelular (vezi fig. 4.51). Un astfel de proces implică o cheltuială mai mică de energie decît transportul transcelular.

Scanned with OKEN Scanner

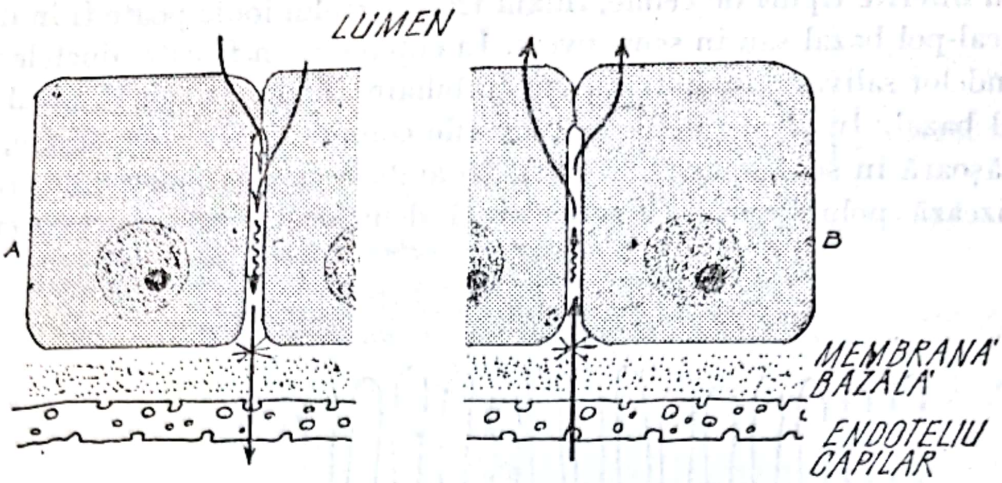


Fig. 4.51. — Schema prezintă sensurile posibile ale transportului ionilor și apei, în funcție de tipul țesutului epitelial: *A* — din lumen către vasul sanguin, ca de exemplu, în vezicula biliară, intestin. Procesul este denumit absorbție. *B* — din vasul sanguin către lumenul delimitat de epiteliu, ca în: plexul coroid, corpul ciliar, glanda sudoripară. Procesul este denumit secreție. Este evidentă trecerea ionilor și a apei, în ambele situații (*A* și *B*), prin spațiul intercelular (*).

4.6.2.2. Transportul moleculelor exogene complexe

4.6.2.2.1. Endocitoza mediată de receptori

Endocitoza mediată de receptori este recunoscută ca un mecanism general, utilizat de numeroase celule, pentru a prelua din mediul extracelular molecule de mare importanță biologică. La acest proces participă două tipuri de molecule organice: molecula extracelulară denumită generic *ligand*, care urmează a fi înglobată în celulă, și molecula *receptor* — o proteină integrală a membranei care cuprinde trei segmente — exodomeniul cu un fragment glucid, segmentul hidrofob integrat în conținutul lipidic și endodomeniul. Variatele tipuri de molecule înglobate prin endocitoză mediată de receptori (EMR) includ hormonii polipeptidici [exemplu: factorul de creștere epidermic (FCE) și insulina], proteine transportoare, care vehiculează substanțe nutritive sau reglatorii [exemplu: lipoproteinele de joasă densitate moleculară (LDL) — colesterol, transcobalamina II — vitamina B_{12}], enzime lizozomale, asialoglicoproteine (ASGP) și imunoglobuline. Soarta moleculelor interiorizate de celule variază de la degradarea în sistemul lizozomal, cu eliberarea aminoacizilor și a oligozaharidelor (exemplu: ASGP) sau cu eliberarea moleculelor reglatoare (exemplu: LDL și colesterolul), pînă la imobilizarea intracelulară sub o formă nedegradată (exemplu: proteinele vitelusului) sau la transportul transcelular și exocitarea consecutivă (exemplu: imunoglobulinele). De asemenea, soarta receptorilor de suprafață care interacționează specific cu liganzii variază de la aparenta reutilizare în timpul perioadelor de activitate prelungită (exemplu: receptorii LDL și ASGP), pînă la degradarea receptorilor după un val de FMR și desensibilizarea consecutivă a celulelor (exemplu: FCE sau insulina).

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie, celulele organismului uman efectuează diferite funcții, care depind de selectivitatea procesului de endocitoză mediată prin receptori. Mecanismul celular al endocitozei mediate prin receptori a fost explorat pe diferite grupuri de celule epiteliale (nefrocite, enterocite, celule endoteliale), dar mai ales pe *hepatocite*. Hepatocitul prezintă avantajul că endocitează o mare cantitate și o mare diversitate de liganzi, în mod fiziologic. Printre aceștia se includ: ASGP, insulina, glucagonul, prolactina, FCE, transcobalamina II, complexul hepatoglobulină-hemoglobină, hemopexină-fier, glicoproteine cu lanțuri oligozaharidice terminate cu reziduuri de alfa-1,3 fucoză, transferina și imunoglobulina A. Toate aceste molecule sînt introduse în celulă prin endocitoză mediată de receptori care are loc la polul sinusoidal hepatocitar. În plus, soarta liganzilor și a receptorilor lor cuprinde toate modalitățile de endocitoză mediate de receptori, cunoscute pînă în prezent. De aceea, hepatocitele sînt preferate în cercetările prin care se urmărește elucidarea mecanismelor celulare, implicate în diferitele sisteme de ligand-receptor.

Moleculele endocitate de hepatocite urmează una din următoarele *trei căi: a)* ele pot fi transportate în bilă (prin transport transcelular, de la polul sinusoidal la cel biliar); *b)* ele pot fi restituite sîngelui (după ce suferă modificări mici) sau *c)* pot fi transferate lizozomilor pentru a fi degradate. Problema fundamentală este de a ști care este cinetica moleculară și cum intervin diferitele organite celulare pentru a separa proteinele după destinația lor finală, dacă acest proces are loc la suprafața celulei înainte de endocitoză sau în compartimentele intracelulare. Cercetările au dovedit că procesul de segregare a liganzilor de receptori și decizia asupra sorții lor ulterioare este luată în compartimentul intracelular.

Organitele implicate în endocitoza mediată prin receptori sînt: 1) *caveolele acoperite* sau *pits* acoperite (pe fondul citoplasmatic membranele acestora sînt acoperite cu o proteină denumită clatrină care este calcafină); 2) *vezicule primare acoperite* care au diametrul de 0,05—0,08 μm; 3) *receptori* sau *endozomi*, sau vezicule de sortare sau ligandozomi sau compartimentul pentru decuplarea receptorilor și liganzilor (CDRL) — acestea sînt un sistem de organite polimorfe (veziculare și/sau tubulare) delimitate de citomembrana netedă (neacoperite, bogate în colesterol care derivă din fracțiunea golgiană ușoară (cisternele *trans*); în hepatocite, receptozomii sînt numeroși la polul vascular și reprezintă aproape 1% din volumul celulei, iar suprafața membranelor lor se ridică la circa 2 100 cm^2/cm^3, comparativ cu 6 700 cm^2/cm^3 de membrană plasmatică; 4) *o a doua populație de citomembrane acoperite cu clatrină*, heterogene ca formă (incluzînd vezicule și/sau tubuli mici), asociate cu elemente golgiene grele (adică cu cisternele *cis*) și care fac parte din sistemul GERL *(Golgi-Endoplasmic Reticulum Lysosoma)* descris de Novikoff și Novikoff (1980) sau cu *corpii multivezicular*i identificați de Harnick și colab. (1985) (*J.C.M. Biol.*, 100, 1 558—1 569), care prezintă o activitate galactoziltransferazică și arilsulfatazică scăzută; 5) *lizozomii;* 6) *veziculele de exocitoză.*

Receptori sau liganzi, de unul sau mai multe tipuri se concentrează prin selecția lor la nivelul caveolelor acoperite. După internalizarea în caveolele acoperite, complexul receptor-ligand este transferat rapid (în circa 5 minute de la legare) în vezicule neacoperite izolate, denumite *receptozomi* sau *endozomi*. (Endozomii au un pH în jur de 5,0.)

Scanned with OKEN Scanner

Din acest punct liganzii și receptorii urmează una din următoarele căi:

a) O cale fără conservarea liganzilor, dar cu conservarea receptorilor. În această categorie intră *asialoglicoproteinele*, care parcurg cinci etape (fig. 4.52): 1) interiorizarea complexului ligand-receptor în vezicule acoperite; 2) separarea ligandului de receptori în endozomi, datorită pH-ului acid al interiorului acestora: 3) segregarea ligandului de receptor prin trecerea lor în compartimente (vezicule neacoperite) diferite; 4) intrarea liganzilor în lizozomi și degradarea lor; 5) reciclarea receptorilor prin trimiterea lor la suprafața celulară. Această cale este urmată și de alte tipuri de mo-

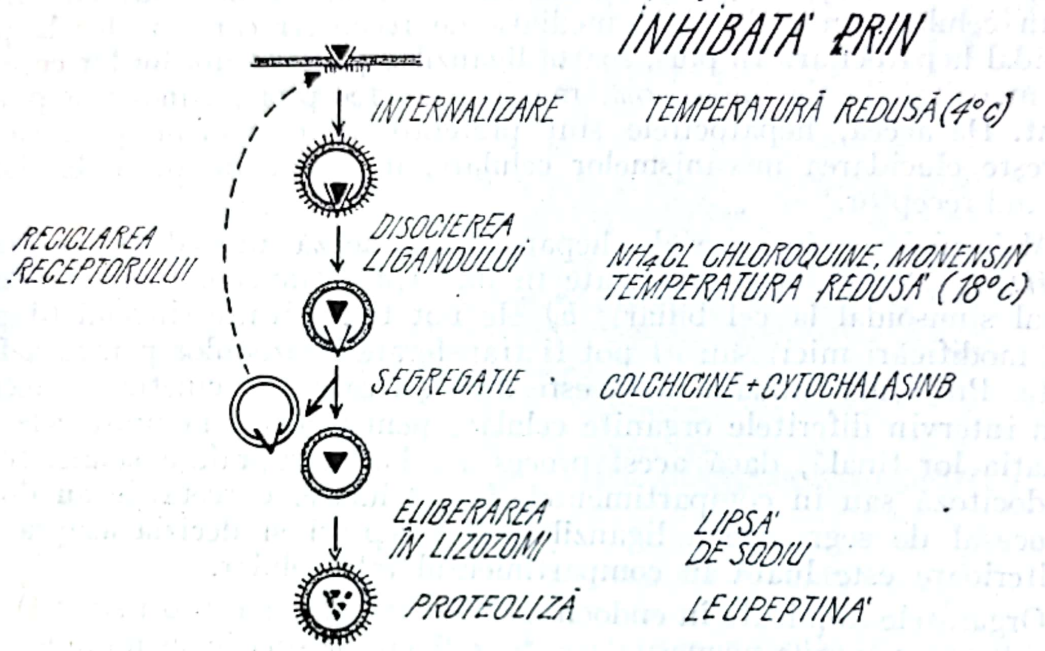


Fig. 4. 52. — Schema endocitozei mediate prin receptori a asialoglicoproteinelor.

lecule, ca de exemplu: LDL asociată cu colesterol, alfa$_2$-macroglobulina (fig. 4.53).

b) Cea de a doua cale are drept consecință conservarea atît a ligandului cît și a receptorilor. Un exemplu în acest sens îl oferă proteina transportoare de fier, numită *transferină*, care, împreună cu receptorul său, ocolește lizozomii, după ce eliberează fierul și revin împreună la polul vascular al celulei. Circuitul începe cînd la polul vascular, ligandul sub formă de *diferitransferină* este legat de receptorul specific la un pH neutru și interiorizat prin intermediul caveolelor acoperite. În celulă, fierul este eliberat, iar complexul transferină-receptor rămîne stabil la pH-ul acid din endozom. Transferina, împreună cu receptorul (după eliberarea fierului) revine la membrana polului apical, unde se disociază de receptori și pătrunde în plasma sanguină, datorită concentrației scăzute și a pH-ului neutru (vezi fig. 4.53).

c) O altă cale, fără conservarea ligandului și receptorului, este cea urmată de hormonii polipeptidici de tipul *factorului de creștere epidermic*, în care atît receptorul cît și ligandul ajung în lizozomi, unde sînt degradați. Aceasta conduce la o rapidă pierdere a populației receptorilor de suprafață din această categorie.

Scanned with OKEN Scanner

d) O variantă a celei de a doua căi, cu conservarea ligandului și con servarea parțială a receptorului, este reprezentată de circuitul urmat de *imunoglobulină*. Imunoglobulina A este legată de receptori la polul vascular al hepatocitului și transferată spre polul biliar cu receptor cu tot, fără a fi degradați de lizozomi. Imunoglobulina A este secretată în bilă împreună cu o porțiune din molecula receptorului, restul moleculei receptorului rămînînd legat de membrană.

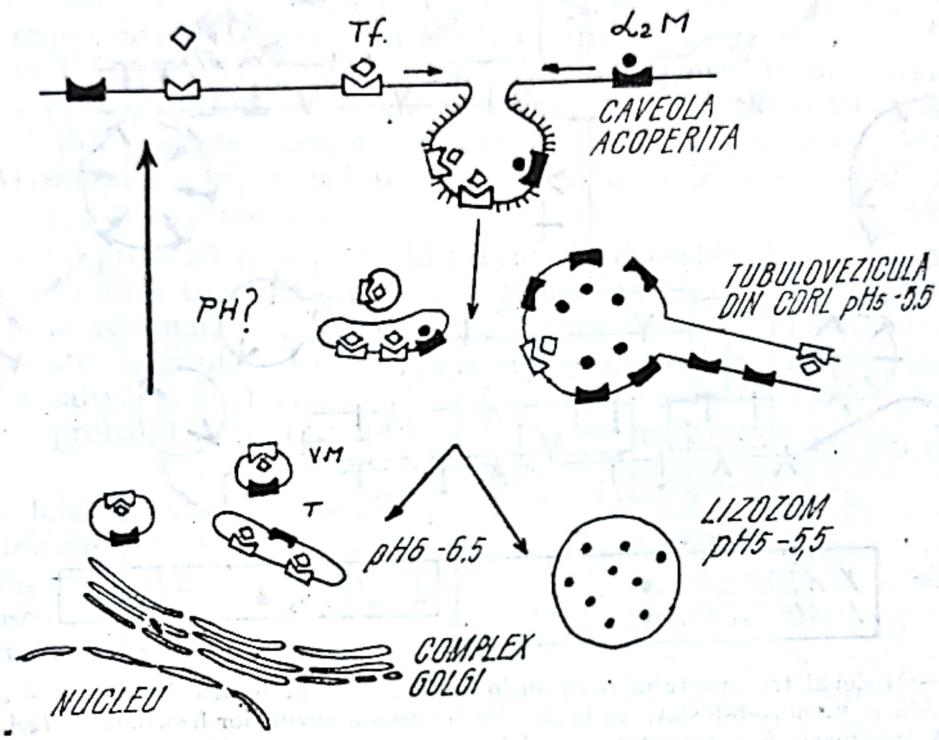


Fig. 4. 53. — Model al căii endocitice a transferinei *(Tf)* și a alfa$_2$-macroglobulinei (alfa$_2$M). Atît Tf cît și alfa$_2$M intră în celulă prin caveole acoperite cu clatrină, care „livrează" complexele *ligand*-receptor unui compartiment periferic de vezicule mici și tubuli. Într-o cisternă tubulo-veziculară mare pH-ul acid (5—5,5) duce la disocierea alfa$_2$M de receptori, dar nu și la disocierea Tf. Alfa$_2$M difuzează către partea mare veziculară, iar receptorul pentru alfa$_2$M și complexele Tf-receptor rămîn în elementele tubulare. Vezicula mare „achiziționează" enzime lizozomale, pH-ul ei rămîne acid, ea devine lizozom. Elementele tubulare se separă de veziculele mari, pH-ul lor crește la 6.5. Complexele Tf-receptor și receptorul pentru alfa$_2$M se acumulează în vezicule mici *(VM)* și tubuli *(T)*, lîngă complexul Golgi, și de aici sînt transportate la suprafața celulei.

În mod similar, *imunoglobulina G* din laptele matern este legată de receptorul specific la polul apical al epiteliului intestinal al sugarului, iar complexul este transferat pe fața laterală a enterocitului, unde se disociază și ajunge în sînge conferind imunitate nou-născutului, pînă la formarea propriului sistem imun.

În figura 4.54 este prezentat un model după H. Geuze și colab. (*Cell.*, 1984, 37, 195—204), care ilustrează traficul complexului receptor-ligand în celula hepatică pentru asialoglicoproteine, imunoglobulina A și manozo-6--fosfat *(marker* pentru enzimele lizozomale).

Scanned with OKEN Scanner

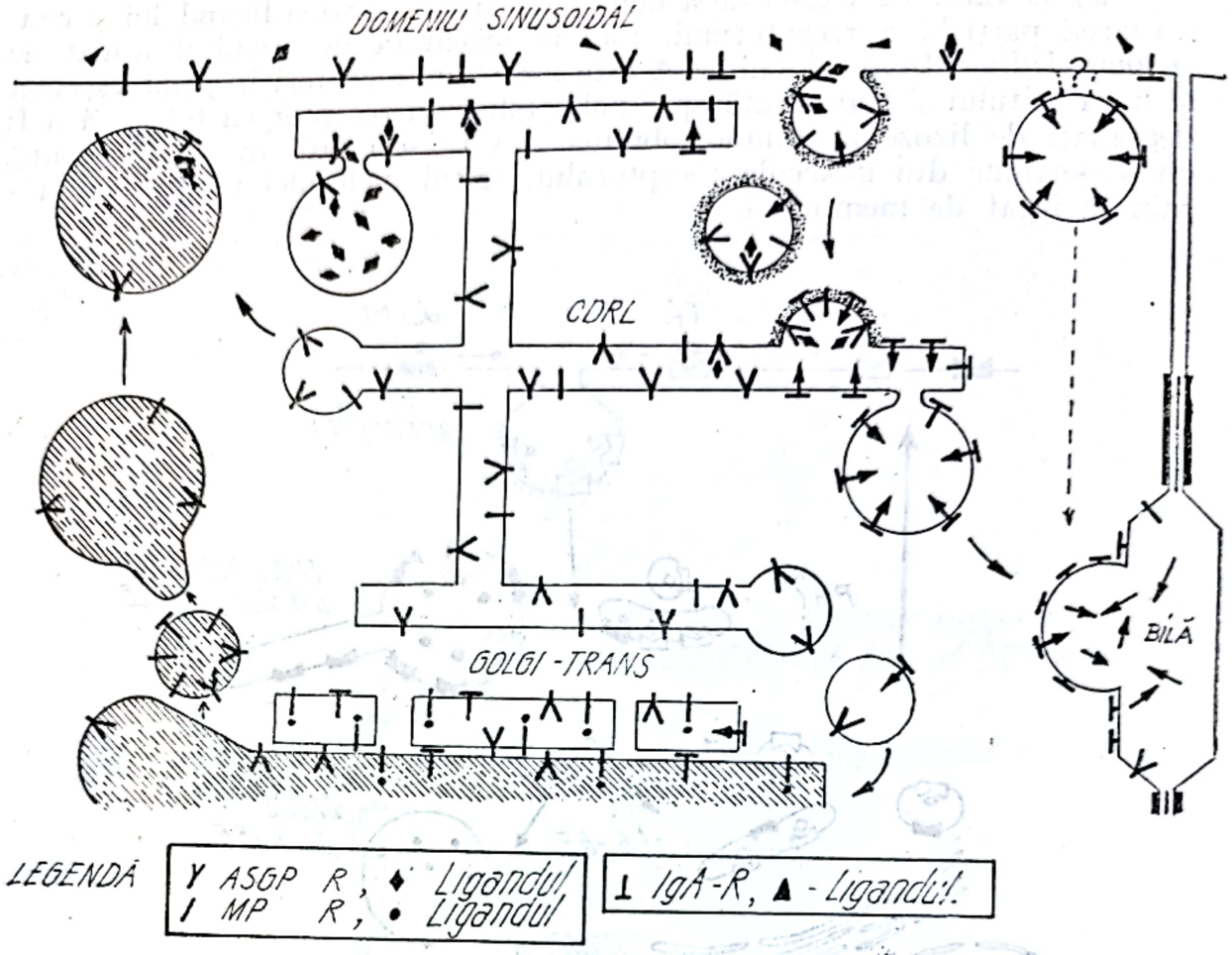


Fig. 4.53. — Model al transportului receptorilor și liganzilor în hepatocit. *ASGP* — asialoglicoproteine; *MG* — manozo-6-fosfat, radicali din molecula enzimelor lizozomale; *IgA* — imunoglobuline A (polimer); *R* — receptor; *CDRL* — compartimentul de decuplare a receptorilor de liganzi. Pe schemă, calea secretorie este haşurată, calea endocitică este nehaşurată. *Calea secretorie.* Sinteza receptorilor de către RER și transportul lor în aparatul Golgi nu au fost figurate în schemă. Toți cei trei receptori sînt localizați în cisternele Golgi (în care MP-R este deja legat de ligandul său). Receptorii sînt de asemenea prezenți în granulele secretorii, însă într-o proporție mai mică. Granulele esecrtorii reprezintă astfel o cale pentru ca receptorii să ajungă la plasmalemă, aceeași funcție de transfer către plasmalemă avînd-o și veziculele mici, care iau naștere în marginile laterale ale cisternelor-*trans* din aparatul Golgi. *Calea endocitică.* Cele trei tipuri de receptori sînt răspîndiți la întîmplare în plasmalemă de la polul sinusoidal. ASGP-R și IgA-R se cuplează cu liganzii corespunzători (ASGP și IgA) la suprafața celulei. Excepție face MP-R, care este deja cuplat cu ligandul său — enzimele lizozomale purtătoare de radicali manozo-6-fosfat, care în final sînt destinate lizozomilor primari, dar complexul MP-R-ligand este angrenat în ciclul general al receptocilor. Toate aceste tipuri de complexe ligand-receptor, inclusiv receptori liberi, sînt internalizați în vezicule simple și acoperite. Veziculele acoperite își elimină conținutul în CDRL, care este compartimentul prelizozomal (acid) în care ASGP-R și probabil MP-R, dar *nu* și IgA-R se decuplează de liganzi. MP (enzimele lizozomale) și ASGP (care vor fi degradate) se acumulează în vezicule care apoi se transformă în lizozomi. Receptorii se conservă și sînt reciclați spre suprafața celulară (vezi și fig. 4.52). Complexele IgA-R-*ligand* sînt segregate de ceilalți receptori în CDRL din care se desprind vezicule de transfer ce conțin exclusiv aceste complexe. Există posibilitatea ca veziculele de transfer conținînd complexe IgA-R-ligand să ia naștere direct din plasmalemă (vezi dreapta sus, în schemă) și să fie „livrate" polului biliar, fără să treacă prin CDRL. Veziculele cu complexe IgA-R-ligand sînt transferate la cisternele golgiene, dar transportul major este efectuat către polul biliar, unde IgA este secretată împreună cu o porțiune din molecula receptorului, numită CS (componenta secretorie a receptorului). Cealaltă porțiune din molecula receptorului rămîne atașată de membrană.

Scanned with OKEN Scanner

4.6.2.3. Transportul intra- și transcelular al proteinelor secretate de hepatocite

Hepatocitele secretă proteine în două compartimente extracelulare distincte: *a)* în spațiile Disse (alăturate capilarelor sinusoidale) și *b)* în canaliculele biliare. Cantitatea de proteine secretate în plasma sanguină prin spațiile Disse este cu mult mai mare decît cea eliberată în bilă. Proteinele hepatice eliberate în bilă se împart în două categorii diferite. Prima cuprinde aceleași componente ca și cele din plasma sanguină, probabil transportate din sînge în bilă pe o cale transcelulară. *Albumina* este tipul predominant din această categorie. Cea de a doua categorie constă din componente specifice, adică din proteine care nu se găsesc în plasma sanguină, ci numai în bilă. Așa-numita *componentă secretorie* (CS) a polimerului IgA este proteina majoră din această clasă.

CS este o proteină care prezintă un interes deosebit. Ea este sintetizată de celulele epiteliale ca o *proteină transmembranară;* se găsește pe domeniul latero-bazal al plasmalemei, unde acționează ca receptor pentru dimerii de IgA, însă poate fi găsită și în secreția exocrină, ca de exemplu în spută, în lapte, în salivă și în bilă ca *proteină secretorie solubilă* (complexată sau nu cu IgA), probabil după ce a fost detașată de membrană pe cale proteolitică.

În celula hepatică, atît albuminele (proteinele destinate secreției), cît și proteinele integrale ale membranelor plasmatice, pot urma două circuite operaționale. Primul circuit este transportul în lungul „căii secretorii", bine cunoscute pe baza cercetărilor lui Palade, care constă în transportul proteinelor de la locul de sinteză, la plasma sanguină, după ce au fost străbătute o serie de compartimente intracelulare. Acest circuit poate fi denumit *calea intracelulară* — de la *reticulul endoplasmic rugos* — *la membrana plasmatică*. Cel de al doilea circuit operațional este constituit de *transportul transcelular*, de exemplu de la domeniul sinusoidal la cel biliar.

4.6.2.3.1. Calea intracelulară

În hepatocite sînt sintetizate un grup larg de *proteine secretorii* care, de la locul de sinteză pînă la locul de descărcare în plasma sanguină, urmînd calea secretorie clasică, au nevoie de minimum 20—25 minute (fig. 4.55.). Glicoproteinele destinate secreției sînt sintetizate și ele în grup, dar fucosilarea determină prelungirea cu circa 10 minute a duratei transportului intracelular. În acest caz transportul durează circa 30 minute de la locul sintezei la locul descărcării, incluzînd și o fază Golgi de circa 10 minute pentru fucosilare.

Cercetările recente ale lui Palade și ale colaboratorilor săi demonstrează cu claritate că ieșirea din cisternele golgiene a subfracțiunii de *proteine fucosilate destinate membranei plasmatice* hepatocitare este întîrziată semnificativ față de fucosilarea proteinelor secretorii. Rămînerea în urmă a proteinelor de membrană fucosilate este de circa 30 minute față de proteinele secretorii. Componenta secretorie (CS) este o proteină fucosilată, destinată membranei polului vascular, unde în prima etapă a evoluției sale intrahepatocitare funcționează ca receptor pentru $(IgA)_2$.

Scanned with OKEN Scanner

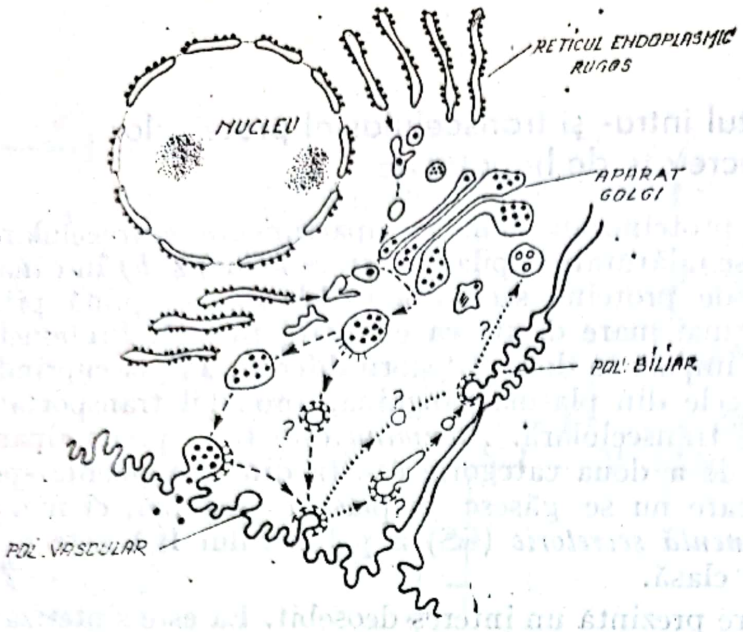


Fig. 4.55. — Reprezentarea schematică a transportului proteinelor secretate de hepatocite: - - - - cale intracelulară; . . . cale transcelulară (?) — marchează căi probabile, incomplet precizate. De la capilarul biliar, membrana conținînd restul moleculei CS (endodomeniul și domeniul hidrofob) este înglobată în corpii multiveziculari și apoi în lizozomi pentru a fi degradată.

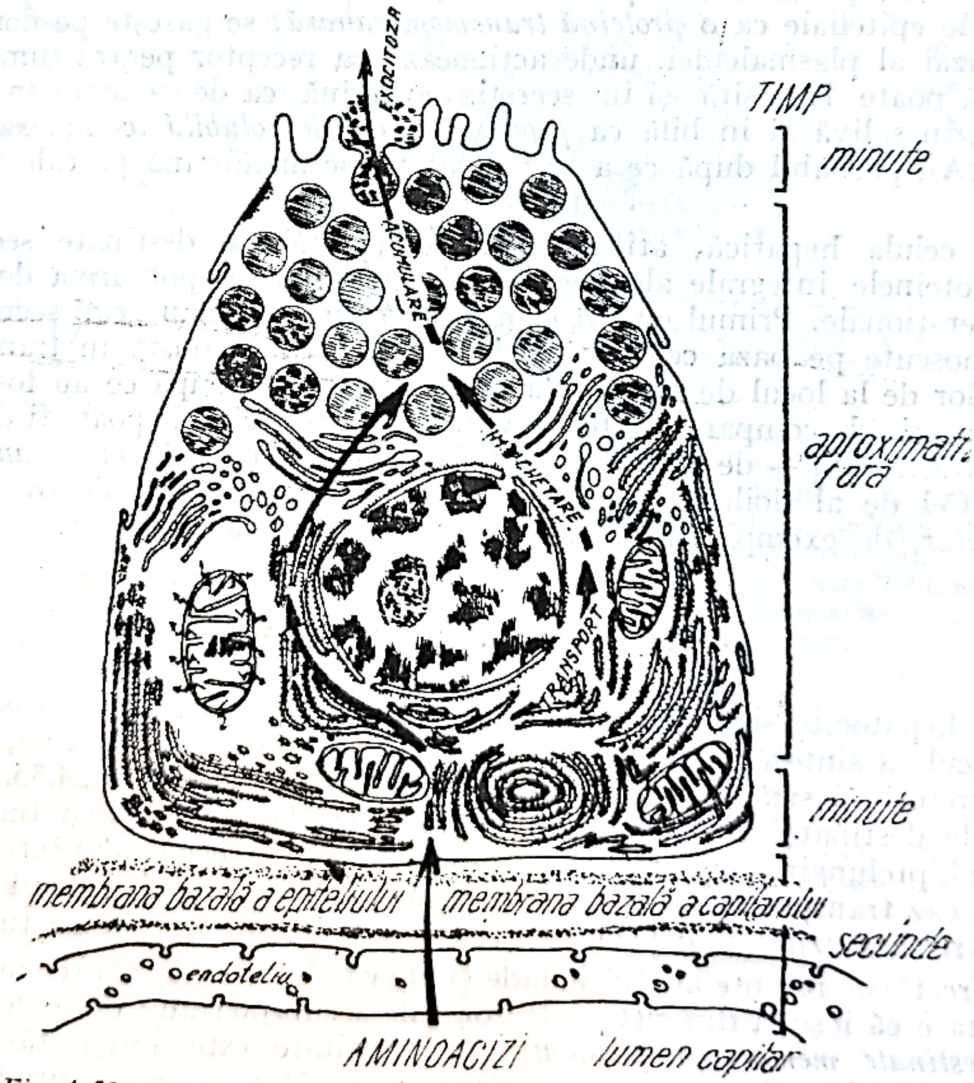


Fig. 4.56. — Schema ultrastructurii unei celule seroase (celula acinoasă pancreatică) avînd localizate principalele etape ale procesului secretor, precum și calea intracelulară urmată de produsul secretor. De notat polarizarea evidentă a organitelor: reticulul endoplasmic rugos, abundent, localizat bazal; aparatul Golgi și granulele secretorii așezate supranuclear. În dreapta schemei este menționată durata fiecărei etape a secreției.

Scanned with OKEN Scanner

Deşi calea intracelulară a proteinelor sintetizate de hepatocit (atît a celor destinate exportului cît şi a celor destinate plasmalemei) pare destul de bine elucidată, numeroase detalii rămîn încă puţin clare. Aşa de exemplu, în conformitate cu datele actuale, fucosilarea este considerată a avea loc în complexul Golgi. Dar, după cum galactoziltransferaza (şi enzimele asociate ei) este restrînsă la anumite cisterne, este posibil ca şi fucoziltransferaza să fie restrînsă la o cisternă specifică. De asemenea, este încă neclară natura veziculelor care transportă proteinele membranare fucosilate, de la complexul Golgi la plasmalemă. (Cercetările recente arată că în celulele hipofizei anterioare, proteinele destinate membranei sînt transportate cu vezicule diferite faţă de cele destinate secreţiei.)

4.6.2.3.2. Calea transcelulară

Calea transcelulară reprezintă cel de al doilea circuit, urmat de această dată de proteinele solubile, în hepatocit. Acest circuit este dirijat de la polul vascular la cel biliar (vezi fig. 4.55) şi destinat fie transportului albuminei plasmatice, reabsorbită la polul vascular, fie transportului CS complexat sau nu cu $(IGA)_2$ care, în cea de a doua etapă a evoluţiei sale intrahepatocitare, se transformă din proteină de membrană a polului vascular în proteină solubilă care este secretată în bilă. Această transformare are loc, probabil, după ce CS ajunge în plasmalema polului biliar, tot ca proteină integrală, unde este apoi eliberată prin proteoliză limitată. Domeniul hidrofob şi endodomeniul acestei proteine integrale rămîn inserate în plasmalemă, apoi sînt înglobate în corpii multiveziculari, fiind destinate lizozomilor pentru a fi degradate (vezi fig. 4.54 şi 4.55). Transportul CS de la polul vascular la cel biliar pe calea transcelulară are loc în *vezicule mici, cu suprafaţa netedă*. Nu sînt cunoscute staţii intermediare în cele două terminale ale căii, dar este posibil ca endozomii să fie implicaţi. Cercetările efectuate de şcoala lui Palade dovedesc că: *a)* pentru albumine calea transcelulară hepatică este o cale relativ rapidă, dar redusă din punct de vedere cantitativ (concentraţia albuminei în bilă este de circa 100 de ori mai mică decît cea din plasma sanguină) şi *b)* componenta secretorie proteică a IgA parcurge ambele căi (şi cea secretorie intracelulară şi cea transcelulară). Timpul necesar parcurgerii ambelor căi este mult mai lung pentru componenta secretorie a IgA decît pentru albumină. Albumina sintetizată de hepatocite ajunge în bilă (după ce a fost eliberată în sînge şi recaptată de hepatocit) în circa 45 minute. Componenta secretorie a IgA are nevoie de cca 80 minute pentru a parcurge cele două căi (intra- şi transcelulară).

4.6.3. SECREŢIA CELULARĂ

Ca şi transportul celular, secreţia este o proprietate fundamentală a tuturor tipurilor de celule. Cu toate acestea, un grup principal de epitelii a adaptează în mod special la funcţia de a elabora produşi de secreţie în seediul extern sau în mediul intern. În cele ce urmează vor fi prezentate procesele moleculare caracteristice pentru sinteza de proteine, de polipeptide şi amine biogene, de glicoproteine şi de steroizi.

Scanned with OKEN Scanner

4.6.3.1. Celulele secretoare de proteine

Toate celulele sintetizează în mod continuu mici cantități de proteine în scopul înlocuirii subunităților uzate din citoplasma sau membranele sale. Unele celule, însă, sintetizează cantități excesiv de mari de proteine, consecutiv diferențierii lor. În eritroblaste și în celulele embrionare, proteinele sintetizate în exces sînt elaborate și de poliribozomii liberi și rămîn în celula respectivă (fig. 4.56 și 4.57).

Într-un alt grup de celule, proteinele sintetizate de ribozomi sînt *segregate* în reticulul endoplasmic rugos (RER), prelucrate, acumulate și pregătite pentru a fi exportate fie în sînge, fie la suprafața epiteliilor. Celulele acinilor pancreatic și ai parotidei sînt exemplu de țesuturi epiteliale care-și elaborează produsul de secreție proteică (enzime) în cavitățile organismului. Unele tipuri de celule din hipofiza anterioară sînt exemplu de celule epiteliale care secretă proteina (hormonii polipeptidici) în capilarele sanguine.

Modelul pentru studiul ciclului secretor al secreției de proteine este celula acinară pancreatică, obiectul cercetărilor lui Palade în elucidarea acestui proces. La microscopul optic (vezi fig. 4.10) acinul pancreatic are formă rotunjită, cu lumenul foarte îngust, de obicei ocupat de o celulă centroacinoasă (reprezentată doar prin nucleul său). Pe membrana bazală a acinului se află cîteva celule secretorii, cu nucleul rotunjit și citoplasma intens colorabilă cu tehnicile histologice curente. Polul bazal al celulei are aspect striat, intens bazofil, foarte bogat în reticul endoplasmic rugos (ergastoplasma), printre care se intercalează mitocondriile; supranuclear se află aparatul Golgi; polul apical este puternic acidofil și de aspect granular, datorită acumulării granulelor secretorii. O imagine electronomicroscopică completează cu detalii această organizare (fig. 4.56 și 4.57).

Principalele etape ale ciclului secretor pancreatic, așa cum au fost stabilite de Palade, sînt:

a) Aminoacizii din sînge pătrund în citoplasma celulei secretorii acinoase după ce au străbătut peretele capilarului vascular, membrana bazală a epiteliului glandular și membrana plasmatică a polului bazal celular. Pătrunderea aminoacizilor prin membrana plasmatică a polului bazal al celulei epiteliale este accelerată prin intermediul mecanismului de transport activ (cu cheltuială de energie celulară).

b) În citoplasmă, aminoacizii sînt legați de ARN de transfer (ARN-t). Ribozomii liberi se înșiră pe un fir de ARN-mesager (ARN-m) și inițiază sinteza proteinei utilizînd aminoacizi legați de ARN-t pentru a descifra mesajul codificat în ARN-mesager. Codul ARN-m pentru proteinele segregate (în reticulul endoplasmic rugos) cuprinde și un cod pentru o secvență informațională suplimentară a unui aminoacid hidrofob, denumită *peptidă-semnal*. De îndată ce peptida nou-sintetizată se extinde spre centrul ribozomului, semnalul peptidic hidrofobic specific străbate membrana reticulului endoplasmic. Pe măsură ce lanțul proteic este asamblat și injectat în cisterna reticulului endoplasmic, ribozomii suplimentari sînt alăturați simultan între ARN-m cît și membranei RER, constituind polizomi legați de membrane. Semnalul peptidic hidrofobic este excizat după ce proteina asamblată pătrunde în cisterna reticulului endoplasmic. În această fază, proteinele sînt segregate în compartimentul extramatriceal — interiorul cisternei reticulului endoplasmic. Această separare este semnificativă, în sensul

Scanned with OKEN Scanner

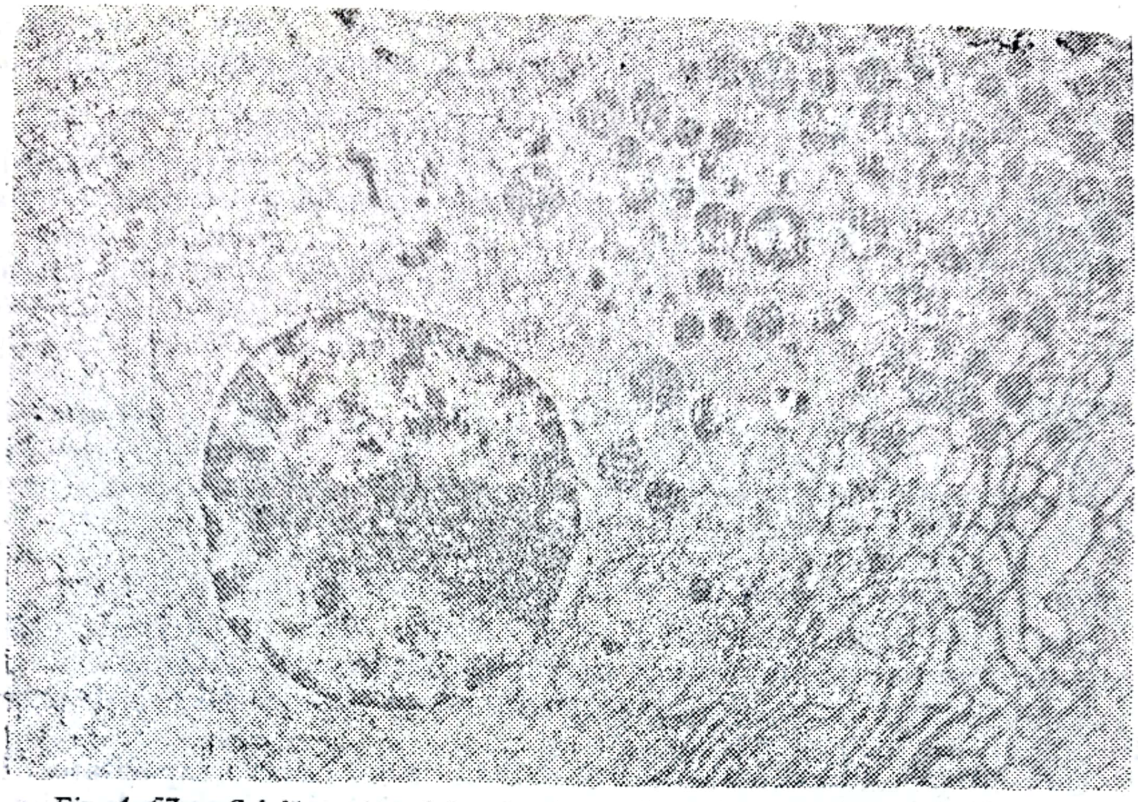


Fig. 4. 57. — Celulă pancreatică acinară exocrină (electronomicrografie X 2 000).

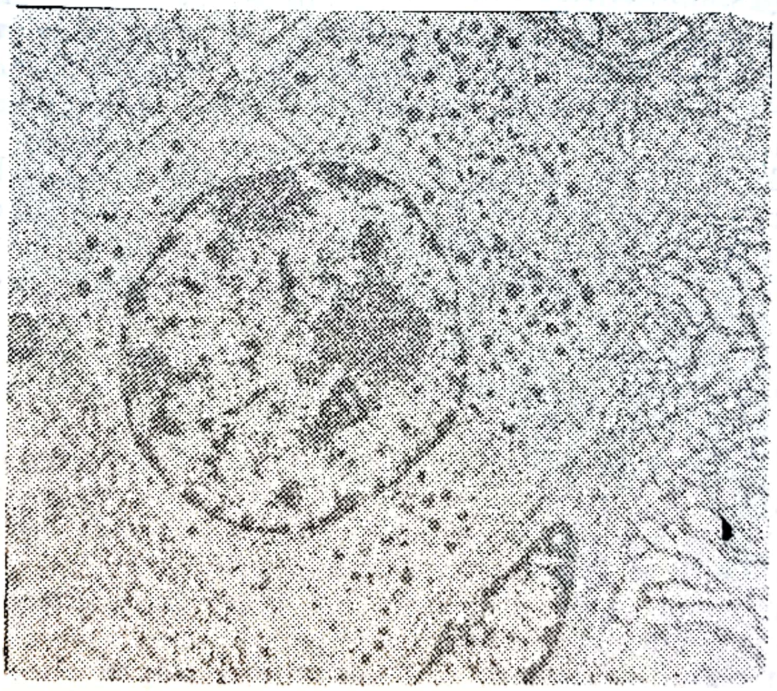


Fig. 4. 58. — Celulă secretoare de polipeptide și amine biogene (celulă beta-pancreatică, elecfronomicrografie X 2 000).

că produsul secretor, adeseori reprezentat de membrane digestive, este despărțit de contactul direct cu componentele citoplasmatice.

c) Odată segregate, proteinele sînt transportate din reticulul endoplasmic în aparatul Golgi. Transferul are loc prin intermediul unor micro-

Scanned with OKEN Scanner

vezicule care conțin proteine — *veziculele de transfer* — care se formează din reticulul endoplasmic și migrează pentru a fuziona cu suprafața convexă a cisternelor golgiene.

d) Materialul este apoi acumulat în cisternele Golgi.

Pe fața matură (concavă) a aparatului Golgi se formează muguri, de asemenea pe fața laterală și la extremitățile cisternei superioare. Aceștia cresc și se detașează constituind *veziculele secretorii* sau *granulele secretorii.*

e) La rîndul lor, granulele nou-formate migrează către polul apical și conținutul lor devine din ce în ce mai dens; ele au fost denumite *granule mature.* Perioada de acumulare a granulelor secretorii variază de la un tip de celulă la altul.

f) Pentru ca celula să-și elimine produsul de secreție, membranele granulelor secretorii fuzionează cu membrana celulară și conținutul veziculei este eliminat printr-un proces denumit *exocitoză.* Și acest proces este dependent de energia furnizată de mitocondrii.

4.6.3.2. Celulele secretoare de polipeptide și amine biogene

Sînt celule cu funcție endocrină, distribuite difuz în diferite organe, unde se dispun uneori grupat, formînd mici structuri glandulare.

În continuare redăm trăsăturile morfologice, histochimice și funcționale comune ale acestor celule.

Una dintre caracteristicile definitorii ale acestora este capacitatea de a stoca în citoplasmă amine biogene, fie gata sintetizate ca: adrenalina, noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, fie aminoacizii precursori ai acestora, din care sintetizează aminele corespondente, avînd astfel o intensă activitate a aminoaciddecarboxilazei. Datorită caracteristicii menționate, celulele sînt denumite celule ale sistemului APUD (*A*mine *P*recursor *U*ptake and *D*ecarboxylation).

Granulele secretorii ale acestor celule conțin atît amine biogene cît și polipeptide cu greutate moleculară mică. Caracterizarea polipeptidelor sintetizate și secretate a făcut posibilă, în funcție de aceasta, folosindu-se tehnica imunofluorescenței, identificarea mai multor tipuri de celule APUD (tabelul 4.V).

Au fost identificate, la mamifere și om, aproximativ 30 de tipuri celulare care aparțin acestui grup, identificarea fiind în curs, întrucît există încă celule APUD cu funcție nedeterminată.

O parte din celulele APUD au originea embriologică comună în creasta neurală; evolutiv, ar proveni din celule a căror funcție originară a fost doar sinteza, stocarea și eliminarea aminelor biogene, ulterior cîștigînd proprietatea de a sintetiza și secreta în paralel și polipeptide.

La microscopul optic citoplasma lor apare slab bazofilă. Electronomicroscopic sînt evidente: granule secretorii rotunde, mici (100—200 nm), aglomerate în regiunea celulară din vecinătatea capilarului, reticul endoplasmic rugos și aparat Golgi slab reprezentate.

Avînd în vedere funcția de sinteză și secreție a polipeptidelor, era de așteptat ca reticulul rugos și aparatul Golgi să fie bine dezvoltate, dar, deși aceste celule sintetizează proteine, cantitatea sintetizată este mică, ceea ce se corelează cu faptele de observație ultrastructurală. De exemplu, sinteza de proteine din celula beta-pancreatică este 1/50 din sinteza proteică a celulei pancreatice exocrine (fig. 4.58).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4.IV

Unele dintre cele mai bine cunoscute celule APUD prezente în organismul uman

Numele celulei	Organul	Polipeptidul produs	Amina biogenă
C	Hipofiza anterioară	ACTH	Triptamină?
M		MSH	Triptamină?
A	Insula Langerhans	Glucagon	Dopamină
B		Insulină	Dopamină
D		Somatostatină	5—HT (serotonină)
AL	Stomac	Glucagon	—
G		Gastrină	—
EG	Intestin	Glucagon	—
S		Secretină	—
D		Somatostatină	—
C (parafoliculară)	Tiroidă	Calcitonină	5—HT?
Cromafină A	Medulosuprarenală	Cromogranină	Adrenalină
Cromafină NA			Noradrenalină

În patologia umană sînt cunoscute situațiile în care celulele sistemului APUD proliferează producînd tumori, denumite generic apudoame. Dintre acestea, menționăm tumorile celulelor producătoare de gastrină din insulele pancreatice, cu corespondentul clinic —sindromul Zollinger-Ellison—, tumorile producătoare de calcitonină din tiroidă.

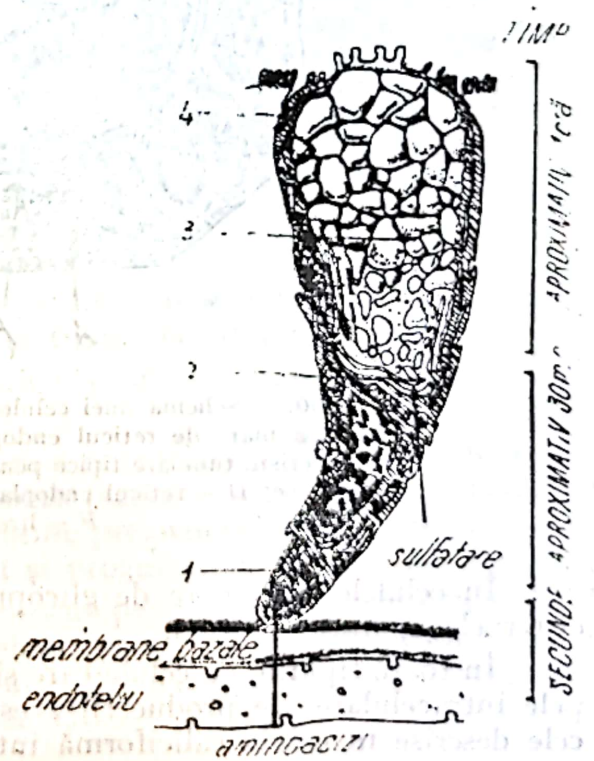


Fig. 4. 59. — Schema ultrastructurii unei celule caliciforme și a secreției de mucus: *1* — sinteza proteinelor din aminoacizi în reticulul rugos; *2* — sinteza polizaharidelor în aparatul Golgi; *3* — acumularea glicoproteinelor (produsul secretor) depozitate în vezicule secretorii, supranuclear, la polul apical al celulei; *4* — exocitoza. În dreapta schemei este menționată durata fiecărei etape a procesului secretor.

4.6.3.3. Celulele secretoare de glicoproteine

Din acest grup de celule cu funcție exocrină este tipic exemplul celulei caliciforme, prezentă printre celulele epiteliului intestinal, cu aspectul său globulos, avînd acumulate supranuclear, numeroase granule secretorii mari, slab colorabile cu tehnicile uzuale (de exemplu: H.E.), granule care umplu și destind celula în această regiune.

Nucleul celulei, alungit, este situat la baza acesteia, unde se găsesc numeroase cisterne de reticul endoplasmic rugos. Aparatul Golgi, localizat supranuclear, este foarte bine dezvoltat, indicînd rolul important pe care-l are în acest tip de celulă.

Demonstrat autohistoradiografic, în această celulă, aminoacizii sînt asamblați în proteine, în reticulul endoplasmic rugos, aceeași metodologie arătînd că la crearea complexului glicoproteic, care reprezintă produsul secretor final, participă atît reticulul cît și aparatul Golgi (fig. 4.59).

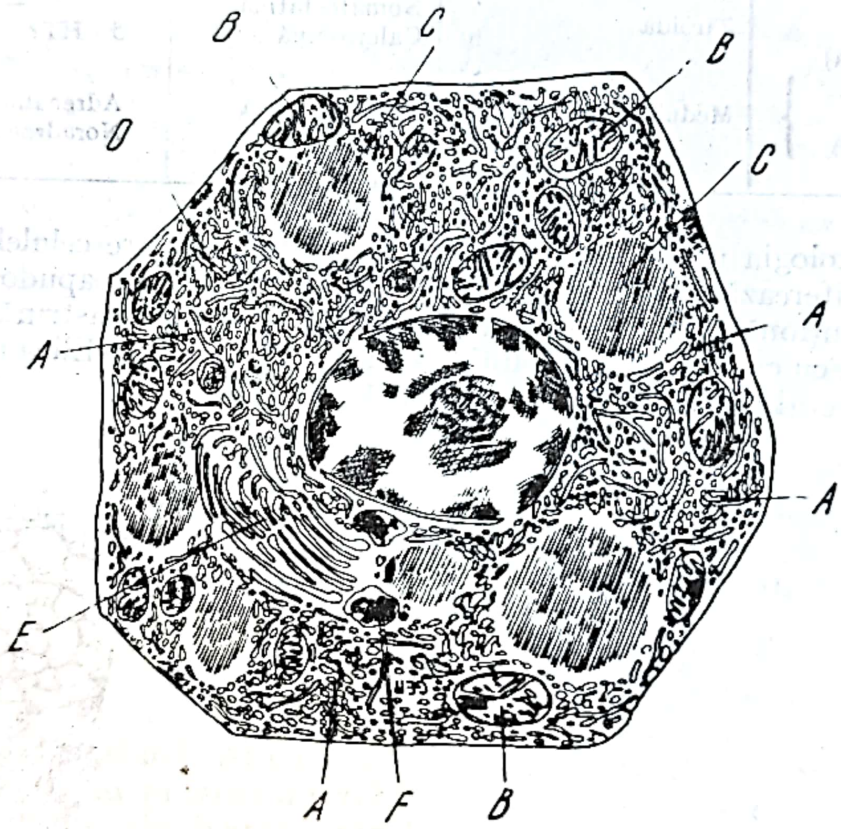


Fig. 4. 60. — Schema unei celule secretoare de steroizi: se observă cantitatea mare de reticul endoplasmic neted *(A)*: mitocondriile *(B)* au criste tubulare tipice pentru acest tip de celulă; *C* — picături lipidice; *D* — reticul endoplasmic rugos, rar; *E* — zonă Golgi; *F* — lizozomi.

În celulele secretoare de glicoproteine sulfatate, sulfatarea are loc în cisternele aparatului Golgi.

În toate tipurile de celule care sintetizează și secretă glicoproteine, etapele intracelulare ale producerii acestora sînt în mare măsură identice cu cele descrise în celula caliciformă intestinală.

Scanned with OKEN Scanner

4.6.3.4. Celulele secretoare de steroizi

Acest tip de celule, cu funcție endocrină, sînt specializate pentru sinteza, stocarea și secreția hormonilor steroidieni, fiind localizate în testicule, ovare, glandele corticosuprarenale.

Caracteristicile morfofuncționale comune sînt următoarele (fig. 4.60 și 4.61):

a) Forma celulelor este rotunjită sau poliedrică, avînd citoplasma acidofilă, în care se găsesc un număr variabil de picături lipidice; nucleul ocupă o poziție centrală.

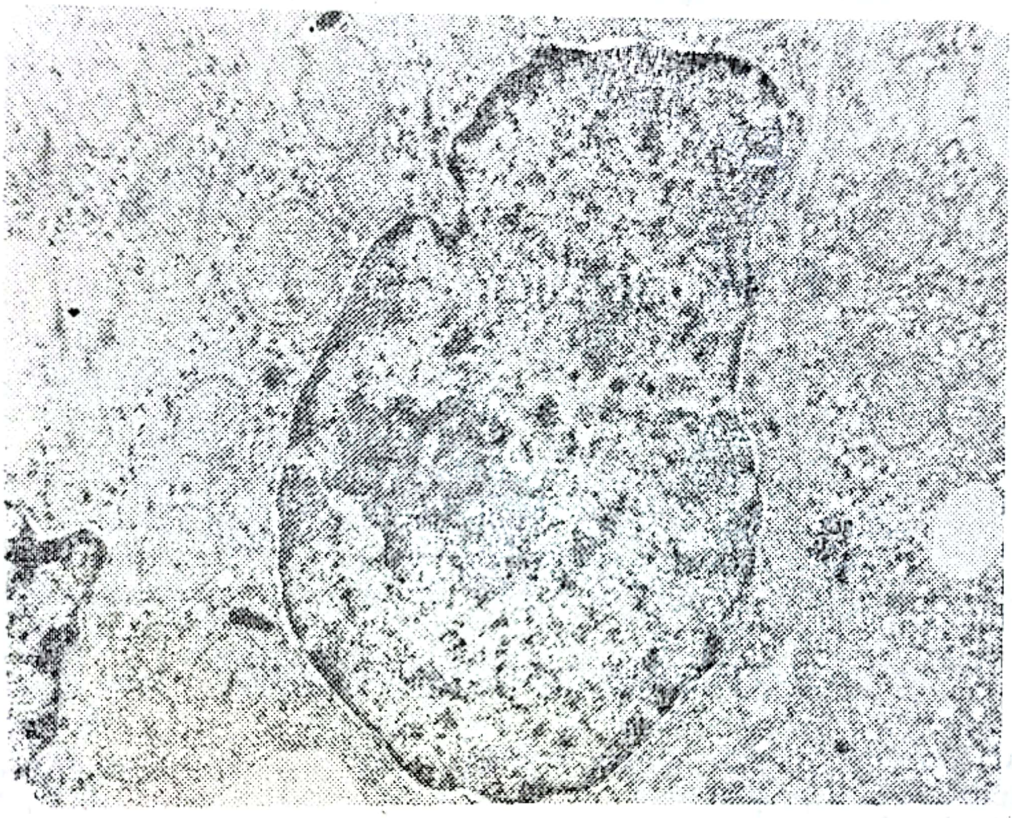


Fig. 4. 61. — Celulă secretoare de steroizi — corticosuprarenală (electronomicrografie × 3 300).

b) Citoplasma celulelor conține o cantitate foarte mare de reticul endoplasmic neted, cu aspect de cisternă și tubuli bogat anastomozați.

c) Mitocondriile sînt caracteristice celulelor secretorii de steroizi, avînd criste tubulare.

d) Funcțional, reticulul endoplasmic neted conține enzime care sintetizează colesterol din molecule precursoare (acetat, de exemplu), putînd, de asemenea, în testicul și ovar, să transforme pregnenolonul în hormoni steroidieni androgeni și, respectiv, estrogeni și progestogeni.

Mitocondriile, în afara rolului cunoscut pe care-l au de a produce ATP ca sursă de energie pentru întreaga celulă, în celulele secretoare de steroizi produc pregnenolon, intervenind și în alte etape ale sintezei de steroizi, așa cum este demonstrat în corticosuprarenală.

Scanned with OKEN Scanner

e) Aşadar, sinteza de steroizi presupune o strînsă interrelaţie funcţională a reticulului endoplasmic neted cu mitocondriile, evidenţiabilă de altfel şi ultrastructural, prin apoziţiile frecvent întîlnite între cele două organite.

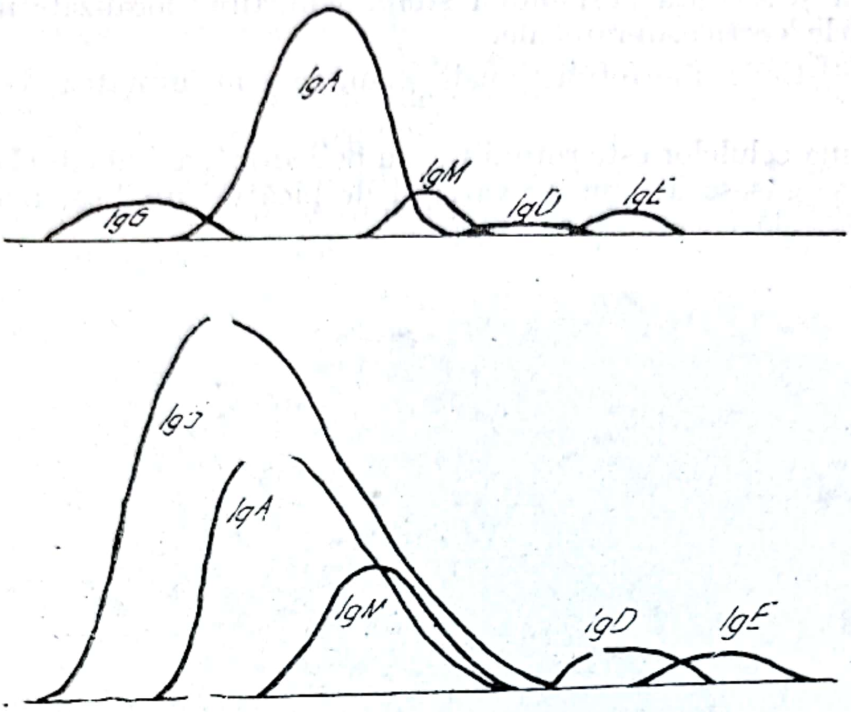


Fig. 4. 62. — Concentraţia Ig în diferite lichide din mediul intern uman: *sus* — umoare apoasă, lichid cerebrospinal, sinovial, pleural, peritoneal, salivă, lacrimi, lichid nazal, traheobronşic, suc intestinal, bilă, secreţia glandelor colului uterin; *jos* — concentraţia Ig în plasma sanguină.

4.6.4. EPITELIILE ŞI IMUNITATEA

Cum am menţionat, toate epiteliile se sprijină pe un ţesut conjunctiv lax, numit *lamina propria* (corion), cu care cooperează funcţional. Epiteliile de acoperire, împreună cu *lamina propria*, formează tunica internă a organelor cavitare, numită mucoasă.

Mucoasele vin în contact cu mediul extern şi de aceea sînt expuse permanent la contactul cu antigenii. Secreţiile externe care acoperă epiteliile mucoaselor, formează un sistem imunologic de apărare a organismului. Cea mai mare parte a conţinutului secreţiilor externe este reprezentată de produsul de secreţie seros şi mucos al glandelor exocrine, asociate epiteliilor de acoperire. Secreţiile externe ca: saliva, lacrimile, secreţia nazală, traheobronşică, sucul intestinal, bila, laptele, colostrul, sudoarea, fluidul produs de glandele colului uterin, conţin însă şi o cantitate considerabilă de anticorpi (imunoglobuline). Spre deosebire de fluidele mediului intern, care conţin predominant anticorpi din clasa IgG, secreţiile externe conţin predominant IgA (fig. 4.62). Secreţia de anticorpi la suprafaţa mucoaselor este reglată independent de cea din fluidele mediului intern (plasma sanguină, lichidul pleural, lichidul peritoneal, lichidul cerebro-spinal). Sistemul imunologic comun suprafeţelor mucoase este numit *sistemul imun secretor*.

Scanned with OKEN Scanner

În secreţiile externe ale mucoaselor, raportul cantitativ IgG/IgA este mai mic decît 1, comparativ cu 4/1 sau 5/1 în plasma sanguină. În afară de IgA, secreţiile externe conţin IgM şi IgE în cantităţi mai mari decît s-ar explica prin simpla transsudare din plasmă.

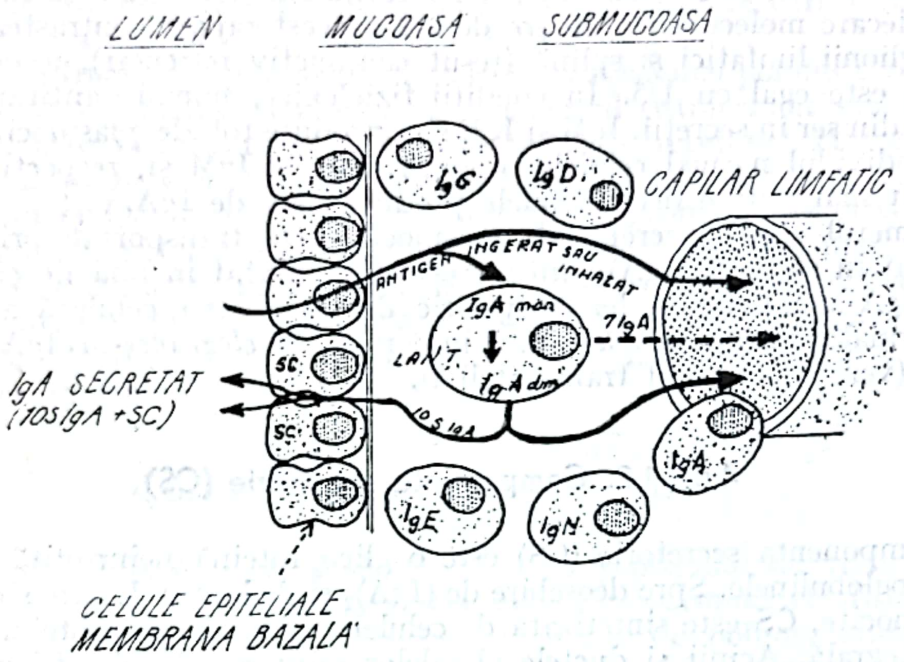


Fig. 4. 63. — Secreţia transepitelială de sIgA.

Imunoglobulinele IgA, IgM şi IgE din sucul intestinal, secreţia nazală, saliva etc. sînt produse, în mod normal, în cea mai mare parte, de către *plasmocite*, celule care aparţin ţesutului conjunctiv al *laminei propria* din mucoasă. În unele secreţii, cantităţi semnificative provin, prin transport, din plasma sanguină — de exemplu în bilă, unde ele sînt transportate de către hepatocite.

4.6.4.1. Structura IgA serice şi IgA secretorii

Există diferenţe semnificative între structura IgA serice şi IgA secretorii (sIgA). IgA din serul uman există mai ales ca monomer cu coeficientul de sedimentare 7S, împreună cu formele polimerice, în proporţie de 10—15%, în timp ce sIgA din secreţiile externe este aproape în exclusivitate sub formă de *dimer*, coexistînd cu foarte mici cantităţi de monomer, trimer, tetramer şi pentamer. Molecula de sIgA conţine în afară de dimerul menţionat, o moleculă numită *componenta secretorie* (CS) şi o moleculă de glicopeptid, numită *lanţ J* (pentru detalii vezi capitolul 3).

4.6.4.1.1. Dimerul $(IgA)_2$

Dimerul $(IgA)_2$ din molecula de sIgA este secretat de către plasmocitele situate în *lamina propria*, în apropierea epiteliului de acoperire. Majoritatea plasmocitelor din *lamina propria* secretă sIgA. De exemplu, *lamina propria* din mucoasa tractului gastro-intestinal conține 20—30 de molecule de IgA pentru fiecare moleculă secretoare de IgG. Acest raport contrastează cu cel din ganglionii limfatici și splină (țesut conjunctiv reticular), unde raportul IgA/IgG este egal cu 1/5. În condiții fiziologice, numai cantități mici de IgA trec din ser în secreții. IgM și IgE sînt produse tot de plasmocitele locale, dar la individul normal celulele producătoare de IgM și, respectiv de IgE, sînt mult mai puține decît celulele producătoare de IgA.

Dimerul $(IgA)_2$ secretat de plasmocite este transportat prin epiteliu și eliberat în secreții. $(IgA)_2$ din ser este transportat în bilă de către hepatocite. IgA polimeric se leagă specific de membrana celulară a hepatocitelor normale. Ficatul joacă un rol important în *clearance*-ul IgA polimeric din ser (vezi transportul transepitelial).

4.6.4.1.2. Componenta secretorie (CS)

Componenta secretorie (CS) este o glicoproteină neînrudită structural cu imunoglobulinele. Spre deosebire de $(IgA)_2$ și de lanțul J, care sînt produse de plasmocite, CS este sintetizată de celulele epiteliale ca proteină membranară integrală. Acinii și ductele glandelor salivare, ale glandelor lacrimale sau glandelor mamare, epiteliul intestinal, epiteliul respirator, epiteliul căilor biliare, epiteliul colului uterin și al tubei uterine, epiteliul ureterului, produc CS. Aceasta poate fi detectată în epiteliile fetale la vîrsta de 8 săptămîni (înainte de apariția plasmocitelor). CS liberă se găsește în secrețiile externe ale nou-născuților și la pacienții cu agammaglobulinemie. Studiul unor cazuri a permis să se observe că deficiența de CS este asociată cu absența sau scăderea sIgA în fluidele mucoaselor, în ciuda prezenței în sînge a IgA în concentrație normală. Aceasta dovedește indirect că CS este necesară pentru transportul IgA prin epiteliile de acoperire sau glandulare.

Dispunem de numeroase date, obținute în urma cercetărilor efectuate pe diferite celule epiteliale, inclusiv pe hepatocite, prin care s-a stabilit că CS se comportă atît ca receptor pentru IgA cît și ca proteină *transportoare* transepitelială. Specificitatea sa pentru forma polimerică a IgA, rolul veziculelor de cărăuși în transportul transcelular al complexului SC $(IgA)_2$ și, în cazul ficatului, descărcarea în bilă a formei solubile a CS [fie ca CS liberă sau complexată ca CS $(IgA)_2$] au fost prezentate în capitolul precedent, referitor la transportul epitelial.

Cercetările recente ale lui Palade și colaboratorilor săi (*J. cell. Biol.*, 1985, 100, 1 248—1 261) arată că hepatocitele umane și de șobolan au o singură formă de *componente secretorii*, care se presupune că sînt produse de o singură genă. Spre deosebire de acestea, în hepatocitele de iepure și în epiteliul glandelor mamare, au fost detectate două seturi diferite de componente secretorii. Cercetările menționate au dus la următoarele concluzii: *a)* CS este sintetizată de polizomii atașați de membranele reticulului endoplasmic rugos; *b)* ea este apoi translocată prin membrana reticulului endo-

Scanned with OKEN Scanner

plasmic și glicozilată, formînd o *peptidă de 105 K; c)* peptida de 105 K se deplasează din RER în complexul Golgi, unde este desăvîrșită glicozilarea, ceea ce conduce la apariția *formei de 116 K; d)* aceasta din urmă se deplasează la plasmalema polului sinusoidal, unde este inserată sub formă finală, matură, de 120 K. Transportul CS de la complexul Golgi la plasmalema sinusoidală și de la aceasta (după ce leagă IgA) la frontul biliar al hepatocitului este efectuată prin intermediul unor vezicule care provin din fracțiunea grea a complexului golgian.

În forma finală, de proteină integrală a plasmalemei polului sinusoidal, CS cuprinde trei domenii, și anume: 1) segmentul extracelular sau ectodomeniul care este glicozilat și are proprietatea de receptor; 2) segmentul intermediar hidrofob care este inclus în continuumul bilipidic și 3) segmentul intern sau endodomeniul care este hidrofil și, probabil, fosforilat.

În secrețiile externe există și alte tipuri de imunoglobuline — IgG, IgE și IgM — dar numai IgA și IgM au capacitatea de a lega CS covalent sau necovalent. IgG provin în cea mai mare parte din ser prin transsudare, dar pot fi sintetizate și local, de către plasmocite. IgE sînt secretate în mai mare măsură în fluidul nazo-faringian.

4.6.4.2. Transportul sIgA și sIgM

Transportul sIgA și sIgM ilustrează ruta probabilă de transport a imunoglobulinelor. $(IgA)_2$ este produsă și secretată de plasmocitele din *lamina propria*. Cantitatea de monomer în raport cu cea de polimer sintetizată de *lamina propria* ar depinde, printre alți factori, de producția celulelor ce conțin lanțul J intracelular. IgA dimeric complexată cu lanțul J difuzează prin *lamina propria*, traversează membrana bazală și intră în spațiul intercelular. Deoarece porțiunile apicale ale celulelor epiteliale adiacente sînt în apoziție strînsă prin *zonula occludens*, macromoleculele de mărimea IgA nu pot trece în lumen. CS prezentă în membrana celulară a domeniului latero-bazal acționează ca receptor. Ea se leagă de IgA sau IgM și facilitează transportul transcelular printr-un proces de endocitoză, care implică invaginarea membranei celulare și înglobarea IgA și IgM în vezicule mărginite de membrane. Studiile electronomicroscopice sugerează că acest tip de transport este similar cu transportul prin caveole și vezicule acoperite, utilizat de hepatocite pentru unele molecule ca lipoproteinele. Veziculele sînt transportate la domeniul apical (luminal) al celulei epiteliale sau la domeniul biliar al celulei hepatice și apoi sînt exocitate.

4.6.4.3. Rolul sIgA în imunitatea de suprafață

sIgA asigură apărarea primară împotriva unor infecții locale, datorită abundenței lor în salivă, lacrimi, secreție nazală, lichidul prostatic etc. Se pare că funcția principală a sIgA nu este aceea de a distruge antigenii ci, mai degrabă, de a preveni accesul lor în mediul intern. Ele acționează astfel în protecția contra virusurilor, contra bacteriilor sau a toxinelor bacteriene și contra diferiteîor substanțe ce pot deveni antigenice.

Imunitatea antibacteriană se bazează pe diminuarea aderenței bacteriilor la epiteliile mucoaselor. Colonizarea mucoaselor de către bacterii este

Scanned with OKEN Scanner

un fenomen ce implică aderența selectivă a bacteriilor la suprafețele epiteliale. Antigenele celulare de suprafață ale bacteriilor influențează aderența lor la suprafețele mucoaselor. Mucoasele se opun aderenței bacteriilor prin secrețiile externe, mișcarea cililor (în trahee, în tuba uterină etc.), descuamarea epiteliilor. Anticorpii sIgA potențează aceste activități legîndu-se de glicoproteinele suprafeței bacteriilor implicate în aderență, inhibînd astfel colonizarea. De exemplu, sIgA izolate din saliva parotidiană inhibă specific atașarea streptococilor de celulele epiteliale ale mucoasei bucale, dar numai a tipurilor de streptococi pentru care s-a dezvoltat imunitatea de suprafață, prin contacte succesive cu antigenul.

Contrar opiniilor mai vechi, adulții absorb o cantitate mai mică, dar semnificativă de antigeni macromoleculari, prin celulele epiteliale ale mucoaselor. Este probabil că anticorpii secretori specifici contra antigenilor limitează absorbția respectivelor macromolecule intacte, formînd complexe neabsorbabile, care sînt degradate de enzime proteolitice la suprafața mucoasei intestinale. Un mecanism similar acționează în mucoasa respiratorie, neutralizînd antigenii inhalați.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ALITALO K. și colab. — Extracellular Matrix Protein of Human Epidermal Keratinocytes and Feeder 3T3 Cells, *J. cell. Biol.*, 1982, *94*, 497—505.
2. ARVAN P. și CASTLE D. — Plasma Membrane of the Rat Parotid Gland, *J. cell. Biol.*, 1982, *95*, 8—19.
3. BURWEN J. J. și colab. — Transport of Epidermal Growth Factor by Rat Liver, *J. cell. Biol.*, 1984, *99*, 1 259—1 265.
4. CAREY D. I. și colab. — Biosynthesis of Type IV Collagen by Cultured Rat Schwann Cells, *J. cell. Biol.*, 1983, *97*, 473—479.
5. CONNOLLY J. L. și colab. — Comparison of Rapid Changes in Surface Morphology and Coated Pit Formation, *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 457—465.
6. COOK J. și. colab — Etablishment of Plasma Membrane Domains in Hepatocytes, *J. cell. Biol.*, 1983, *97*, 1 823—1 833.
7. DUNN W. A. și HERBBARD A. L. — Receptor-mediated Endocytosis of Epidermal Growth Factor by Hepatocytes, *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 2 148—2 159.
8. EICHNER R. și colab. — Classification of Epidermal Keratins According to their Immunoreactivity, Isoelectric Point and Made of Expression, *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 1 388—1 396.
9. GEUZE H. J. și colab. — Receptor Sorting during Endocytosis, *Cell.*, 1984, *37*, 195—204.
10. GONTAS N. K. și colab. — Endosomes and Golgi Vesicles in Adsorption and Fluid Phase Endocytosis, *J. cell. Biol.*, 1984, *99*, 1 379—1 390.
11. GREEN C. R. și SEVERS N. J. — Junction Connexon Configuration, *J. cell. Biol.*, *99*, 453—563.
12. GRIEPP E. B. și colab. — Participation of Plasma Membrane Proteins in the Formation of Tight Junctions, *J. cell. Biol.*, 1983, *96*, 693—702.
13. HANOVER J. H. și colab. — Kinetics of Transit of Transferrin and E.G.F. through Clothrin-Coated Membranes, *Cell*, 1984, *39*, 283—293.
14. HERZLINGER D. A. și OJAKIAN G. K. — Studies on the Development and Maintenance of Epithelial Cell Surface Polarity with Monoclonal Antibodies, *J. cell. Biol.*, 1987, *98*, 1 777—1 787.
15. HOPKINS C. R. — The Importance of the Endosomes in intracellular Traffic, *Nature*, 1983, *304*, 684—685.
16. HORNICK C. A. și colab. — Isolation and Characterization of Multivesicular Bodies from Rat Hepatocytes, *J. cell. Biol.*, 1985, *100*, 1 558—1 569.
17. INOUÉ S., LEBLOND C. P. și LOURIE G. W. — Ultrastructure of Rechert's Membrane, a Multilayered Basement Membrane, *J. cell. Biol.*, 1983, *97*, 1 524— 1 537.
18. KEFALIDES N. A., ALBER R. și CLARK CH. C. — Biochemistry and Metabolism of Basement Membranes, *Int. Rev. Cytol.*, 1979, *61*, 167—228.

Scanned with OKEN Scanner

19. KERJASCHKI D. şi colab. — Microdomains of Distinctive Glycoprotein Composition in the Kidney Proximal Tubule Brush Border, *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 1 505—1 515.
20. LANE E. B. şi colab. — Co-expression of Vimentin and Cytokeratins in parietal endoderm cell of early mouse embryo, *Nature*, 1983, *303*, 701—704.
21. LINSENMAYER T. F. şi colab. — Thermal Stability of the Helical Structure of Type IV. Collagen with Basement Membranes in situ, *J. cell. Biol.*, 1984, *99*, 1 405—1 409.
22. MADARA J. L. — Increases in Guinea Pig Small Intestinal Transepithelial Resistance Induced by Osmotic Loads are Accompanied by Rapid Alternations in Absorptive Cell Tight Junction Structure, *J. cell. Biol.*, 1983, *97*, 125—136.
23. MISCK D.E. şi colab — Biogenesis of Epithelial Cell Polarity, *Cell.*, 1984, *39*, 537—546.
24. MOLL R. W., FRANKE W., SCHILLER D. L. — The Catalog of Human Cytokeratins, *Cell.*, 1982, *31*, 11—24.
25. PINTO DA SILVA P. şi KACHAR B. — On Tight-Junction Structure, *Cell.*, 1982, *28*, 441—450.
26. REGAUER S., FRANKE W.W. şi VIRTANAN I. — Intermediate Filament Cytoskeleton of amnion Epithelium, *J. cell. Biol.*, 1985, *100*, 997—1 009.
27. RESING K.A. şi colab. — Identification of two Intermediates during Processing of Profilaggrin to Filaggrin in Neonatal Epidermis, *J. cell. Biol.*, 1984, *99*, 1 372—1 378.
28. ROMAN L. M. şi HUBBARD A. L. — A Domain-specific Marker for the Hepatocyte Plasma Membrane, *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 1 488—1 504.
29. SCHIFF J.M. şi colab. — Receptor-mediated Biliary Transport Immunoglobulin A und Asialoglycoprotein, *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 79—89.
30. SIMIONESCU N. şi SIMIONESCU M. — Hydrophilic Pathways of Capillary Endothelium, a Dynamic System in Water Transport across Epithelia (sub red. Ussing H.H. şi Stenknudses) Munksgaard, Copenhaga, 1981, p. 228—247.
31. SIMON M. şi GREEN H. — Enzymatic Cross-Linking of Involucrin and other Proteins Keratinocyte Particulates in vitro, *Cell*, 1985, *40*, 677—683.
32. SZTUL E.S., HOWELL K. E. şi PALADE G. — Intracellular and Transcellular Transport of Secretory Component and Albumin in Rat Hepatocytes, *J. cell. Biol.*, 1983, *97*, 1 582—1 591.
33. SZTUL E. S., HOWELL K.E. şi PALADE G. — Biogenesis of the Polymeric IgA Receptor in Rat Hepatocytes, *J. cell. Biol.*, 1985, *100*, 1 248—1 254.
34. TIMPL R. şi colab. — A Network Model for the Organization of Type IV Collagen Molecules in Basement Membranes, *Europ. J. Biochem.*, 1981, *120*, 203—211.
35. WAN YU-JUI şi colab. — Monoclonal Antibodies to Laminin Reveal the Heterogenitty of B.M., *J. cell. Biol.*, 1984, *98*, 971—979.

Scanned with OKEN Scanner

ȚESUTURILE CONJUNCTIVE
(Textus connectivi)

5.1. DEFINIȚIE, LOCALIZARE, HISTOGENEZĂ, ALCĂTUIRE GENERALĂ

Țesuturile conjunctive sînt cel mai bine reprezentate în organism avînd funcții diferite și importante. Ele intră în componența organelor sau sînt dispuse în spațiile libere dintre ele realizînd conexiunea lor. În țesuturile conjunctive au loc procese metabolice deosebit de active, cu schimburi largi de molecule și ioni între sînge și lichidele tisulare.

Cantitatea de țesut conjunctiv diferă mult de la un organ la altul. Astfel pielea și oasele sînt alcătuite în principal din țesut conjunctiv, în timp ce în sistemul nervos central și periferic sau în unele organe parenchimatoase acesta este foarte puțin reprezentat.

Țesuturile conjunctive derivă din foița embrionară mijlocie, respectiv din mezenchim (mezoblast). Țesutul conjunctiv embrionar este alcătuit din *celule mezenchimale* nediferențiate, cu diametrul de 35—40 micrometri. Nucleul este mare, rotund-oval, bogat în eucromatină în care se găsesc 2—4 nucleoli. Citoplasma abundentă, slab bazofilă, conține puține organite celulare. Celulele au formă stelată datorită prelungirilor ramificate pe care le emit. Prin acestea, celulele mezenchimale vin în contact cu vecinele lor, organizînd o rețea celulară în ochiurile căreia se găsește matrice extracelulară bogată și proteine fibroase de colagen tip III, puțin numeroase. La extremitățile prelungirilor celulare se găsesc joncțiuni comunicante tip *gap*, care permit trecerea unor molecule informaționale de la o celulă la alta, aspect important pentru diferențierea tisulară. Celulele mezenchimale prezintă frecvente mitoze, scopul fiind de a asigura linia celulară respectivă și de a contribui la creșterea țesuturilor conjunctive embrionare. Totodată celula mezenchimală se diferențiază pentru a da naștere — la embrion și făt — celorlalte tipuri de celule conjunctive. Numărul celulelor mezenchimale scade foarte mult încă din perioada de mijloc a dezvoltării intrauterine, pentru ca, după naștere, să rămînă sub formă de insule celulare mici, cantonate în vecinătatea unor vase.

Scanned with OKEN Scanner

Un stadiu mai evoluat, care se interpune între celulele mezenchimale și celulele conjunctive diferențiate este reprezentat de *celulele reticulare*. Diametrul acestora este de 12—15 micrometri; nucleul rotund, situat central, prezintă eucromatină și heterocromatină în părți aproximativ egale și nucleoli vizibili. Citoplasma puțin abundentă, bazofilă, conține organite celulare bine reprezentate, în special ribozomi și mitocondrii. Celula emite prelungiri lungi, puține la număr, care realizează o pseudorețea prin contactul pe care îl stabilesc cu cele ale celulelor învecinate. Celulele reticulare, numeroase în perioada intrauterină, scad progresiv ca număr către sfîrșitul gestației. După naștere și la adulți ele se găsesc doar în organele hemato- și limfopoietice în special, unde organizează stroma de susținere. Celulele reticulare prezintă frecvente mitoze: unele din ele se diferențiază mai rar în alte tipuri de celule conjunctive adulte, altele desfășoară activități de fagocitoză jucînd un rol important în procesele de apărare a organismului.

Țesuturile conjunctive sînt alcătuite din celule conjunctive și *matrice intercelulară*.

Celulele conjunctive sînt de două tipuri: celule conjunctive *propriu-zise* din care fac parte: *a)* fibroblastele, mastocitele, celulele adipoase, celulele endoteliale din vasele sanguine și *b)* celulele de origine sanguină *migrate* în țesutul conjunctiv ca macrofage, plasmocite, leucocite.

Matricea intercelulară cuprinde fibrele conjunctive și substanța fundamentală. Fibrele conjunctive sînt: de colagen, reticulină, elastice și oxitalanice. Substanța fundamentală conține în principal macromolecule complexe, ca glicozaminoglicani, proteoglicani și proteine structurale, precum și lichid tisular.

5.2. CELULELE CONJUNCTIVE PROPRIU-ZISE (CELLULAE TEXTUS CONNECTIVI)

5.2.1. FIBROBLASTUL (FIBROBLASTUS)

Fibroblastul — celula conjunctivă cea mai răspîndită în țesuturile conjunctive — derivă în perioada embrionară din celula mezenchimală iar după naștere, din fibroblastele preexistente.

Indicele de proliferare a fibroblastelor este diferit după regiunile în care se găsesc. În unele condiții patologice, ca de exemplu în psoriazis, fibroblastele proliferează mai rapid decît în țesuturile conjunctive normale. La nivelul lor, în această boală crește de asemenea sinteza de colagen cu 77% și cea de glicozaminoglicani, cu 20—28%.

În țesuturile conjunctive fibroblastul se prezintă sub două forme, cu particularități morfofuncționale distincte: fibroblastul activ, angajat în procese metabolice specifice, și fibroblastul în repaus funcțional, denumit și fibrocit (fig. 5.1).

Scanned with OKEN Scanner

Fibroblastele sînt celule mai puțin mobile — ele se deplasează foarte încet în țesuturile conjunctive. În anumite condiții, sînt mobilizate și direcționate de factori chemotactici din matricea extracelulară, fibronectină, colagen, laminină, peptide derivate din elastină sau tropoelastină.

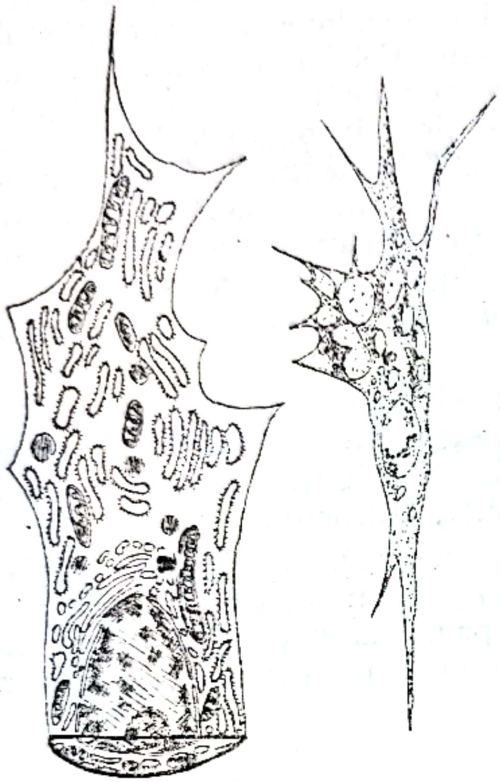


Fig. 5. 1. — Schema organizării structurale a fibroblastului *(stînga)* și fibrocitului *(dreapta)*.

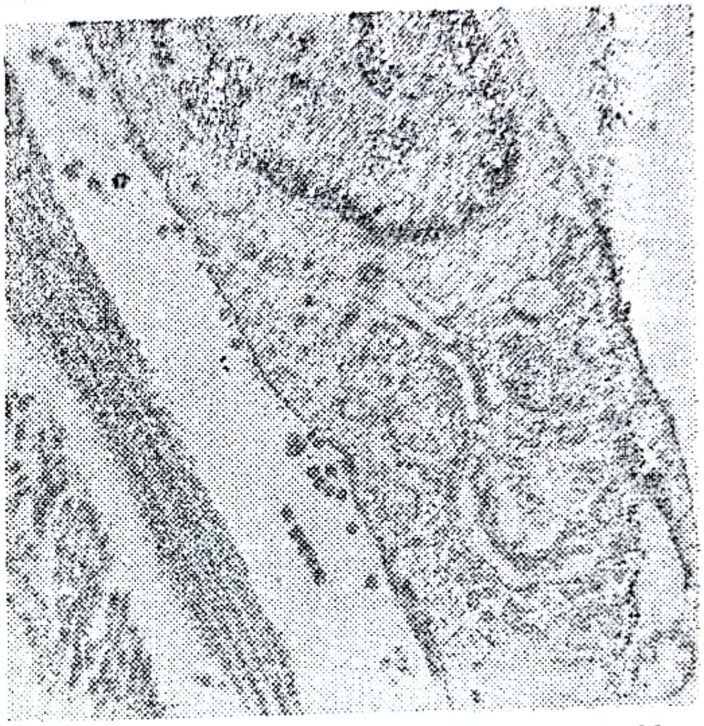


Fig. 5. 2. — Imagine electronooptică a fibroblastului (× 7 200).

5.2.1.1. Particularități morfologice

Fibroblastele active sînt celule cu citoplasma abundentă și bazofilă, cu un aparat de sinteză dezvoltat, reprezentat prin reticul endoplasmic rugos cu cisterne dilatate, mărginite de numeroși poliribozomi, un complex Golgi perinuclear, numeroase mitocondrii lungi și subțiri, lizozomi, centru celular, microtubuli și microfilamente (fig. 5.2). Îndeosebi acestea din urmă sînt bine dezvoltate în fibroblastele din jurul plăgilor pe cale de vindecare. Denumite și „miofibroblaste", ele joacă un rol important în procesul de contracție și refacere a plăgilor. Miofibroblastele sînt de asemenea prezente și în axul vilozităților intestinale.

Nucleul fibroblastului, bogat în eucromatină, este situat central și cu nucleoli vizibili. Membrana fibroblastelor are distribuite pe toată suprafața receptori specifici pentru unele molecule din mediul extracelular. Dintre acestea, mai cunoscuți sînt receptorii pentru insulină, pentru lipoproteine cu densitate mică sau pentru factorul de creștere a epidermului.

Fibroblastul în repaus funcțional sau *fibrocitul* este mai mic decît fibroblastul activ, prezintă un corp alungit, cu capete efilate, bifurcate sau tri-

Scanned with OKEN Scanner

furcate. Nucleul alungit este heterocromatic iar citoplasma prezintă organite celulare reduse. Mai bine exprimat apare compartimentul lizozomal, reprezentat prin autofagozomi. El intervine în procese de digestie localizată a organitelor de sinteză, devenite inutile fibroblastului în repaus funcțional. În condiții de stimulare, cînd este necesară formarea de matrice conjunctivă, fibrocitele se transformă în fibroblaste, luînd toate particularitățile morfofuncționale caracteristice ale acestora.

5.2.1.2. Funcții

Fibroblastele au funcția principală de a sintetiza și secreta proteinele fibroase ale matricei extracelulare cum sînt: macromoleculele de colagen și elastină, precum și complexele glicoproteice de tipul glicozaminoglicanilor, proteoglicanilor și glicoproteinelor structurale, care intră în alcătuirea substanței fundamentale (fig. 5.3).

Colagenul. Cea mai abundentă proteină din țesuturile conjunctive se sintetizează sub forma unui precursor solubil, procolagenul, la nivelul reticulului endoplasmic rugos (4—10 minute), de unde trece în aparatul Golgi (40—60 minute), ajunge la veziculele secretorii (60 minute) și este eliberat din celulă, prin exocitoză, în matricea extracelulară. În condiții de stimulare

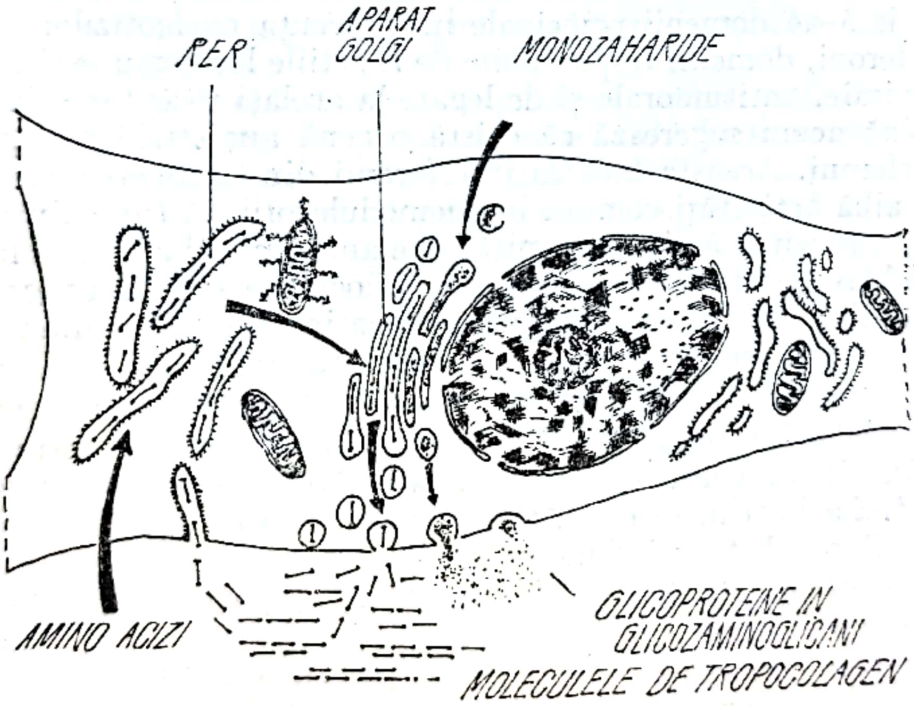


Fig. 5. 3. — Formarea moleculelor de colagen și glicozaminoglicani în fibroblast.

a fibroblastului, precursorii colagenului pot trece direct din cisternele reticulului endoplasmic rugos în mediul extracelular. În momentul excitării ei, molecula de procolagen este scindată prin acțiunea unor peptidaze din membrana celulară. Noua moleculă formată, *molecula de colagen* numită și *tropocolagen*, se polimerizează în substanța fundamentală extracelulară organizînd colagenul interstițial din matricea conjunctivă și colagenul membranelor bazale. Orientarea moleculelor de colagen polimerizat este determinată, după unii, de axul lung al fibroblastului, iar după alții, de anumiți factori

existenți în matricea extracelulară. Există și ipoteza că polimerizarea colagenului ar fi factorul care ar impune orientarea fibroblastelor în matricea extracelulară.

Elastina este sintetizată de către fibroblaste sub formă de moleculă proteică precursoare, denumită *protoelastină*, la nivelul RER, de unde urmează aceeași cale intracelulară ca și procolagenul. Exocitată în mediul extracelular, ea se maturează în elastină, se înconjură de microtubuli și se asamblează pentru a forma fibra elastică.

Glicozaminoglicanii, proteoglicanii sînt de asemenea secretați de fibroblaste; ei sînt sintetizați în RER (componenta protetică), încep glicozilarea în reticul și o continuă în complexul Golgi, unde se sulfatează.

Glicoproteinele structurale sînt reprezentate în cea mai mare proporție prin fibronectină. Aceasta are capacitatea de a stabili relații cu unele macromolecule ca glicozaminoglicanii, colagenul sau receptorii de pe suprafața macrofagelor.

Fibroblastele *secretă interferoni tip I* care sînt glicoproteine cu greutatea moleculară de 16 000—20 000. Asemănător cu interferonul leucocitelor, interferonul fibroblastelor este însă codificat de gene diferite. Între interferonul secretat de fibroblaste și cel secretat de leucocite există o omologie de aproximativ 45% între secvențele nucleotidice ale ARNm ce codifică aminoacizii, o omologie de 3—4 domenii principale în frecvența nucleotizilor ce codifică cei doi interferoni, domenii responsabile de funcțiile lor comune și importante ca cele antivirale, antitumorale și de legare la același receptor celular. Toate datele de pînă acum sugerează că există o genă ancestrală comună pentru cei doi interferoni. Aceasta face ca interferonii din fibroblaste ca și cei din leucocite să aibă activități comune imunomodulatorii, să fie activate de celulele *killer* și să prezinte acțiuni promițătoare antivirale și antitumorale. Interferonul fibroblastelor însă se deosebește biologic de cel leucocitar inducînd răspunsuri antivirale diferite, acțiuni citostatice de grade diferite asupra diverselor tipuri de celule și avînd celule-țintă diferite.

Rata de secreție a diferitelor substanțe de către fibroblaste variază cu vîrsta. Astfel la organismele tinere fibroblastele sînt foarte active, iar procesul de reînnoire a componentelor extracelulare ale țesutului conjunctiv este susținut. La bătrîni este mult diminuat în special procesul de secreție a componenților substanței fundamentale.

În afară de funcția de secreție, fibroblaștii au capacitatea de a înghiți *din matricea extracelulară LDL, insulină, EGF* etc. Înglobarea acestor molecule are loc prin pinocitoză, mediată de receptori specifici care se află la suprafața fibroblastelor. Pinocitoza acestor tipuri de molecule se efectuează pe o suprafață restrînsă a membranei fibroblastului, ușor adîncită și acoperită pe fața internă de clatrine. Această zonă este denumită *coated pit* (caveolă acoperită). La fibroblastele normale, mai mult de 70% din receptorii pentru LDL sînt localizați în *coated pits*. După atașarea moleculelor de receptorii de la nivelul acestora, ele se adîncesc și, prin detașare de membrană, dau naștere unor mici vezicule acoperite sau *coated vesicles*. Întrucît aceste vezicule conțin numeroși receptori, sînt denumite și receptozomi. Ele se unesc în citoplasmă cu lizozomii; moleculele provenite din mediul extracelular sînt degradate de enzimele lizozomale pînă la mici unități, care sînt folosite de celulă pentru activitățile sale metabolice. Formarea complexelor

Scanned with OKEN Scanner

LDL-receptori este o treaptă importantă și necesară în reglarea sintezei și degradării colesterolului. În boli genetice familiale, fibroblastele sînt lipsite de receptori pentru LDL și deci incapabile de eliminarea acestora din mediul extracelular. Purtătorii unei asemenea anomalii genetice sînt hiperlipemici.

Modulația este procesul prin care fibroblastele își modifică aspectul morfofuncțional în raport cu micromediul înconjurător. Aceste modificări, rareori mari și spectaculoase, sînt de obicei minore și reversibile. Modulația depinde foarte deseori de interacțiunile cu celulele vecine sau de recepționarea unor semnale, în general hormonale. Țesutul conjunctiv din piele este cel mai bun exemplu de modulare a fibroblastelor determinată de influența exercitată de celulele vecine.

Un alt fenomen observat la fibroblaste este cel de *non-echivalență*, care presupune că celulele, deși diferențiate în același fel, pot avea informații poziționale diferite. Fibroblastele din dermul pielii ca și celulele sistemului nervos sînt exemplele cele mai tipice pentru fenomenul de non-echivalență. În acest sens, fibroblastele dermice din diferite regiuni ale pielii, induc formarea de epiderme diferite sub aspect morfologic și funcțional. Încă de la embrion dezvoltarea epidermului (specializarea lui regională) este guvernată de fibroblastele din dermul subiacent, acțiune ce se continuă și după naștere. Experimental, s-a observat că dacă la embrion se combină stratul epidermic al urechii cu țesutul conjunctiv dermic al pielii, epidermul care se dezvoltă la ureche ia aspectul tegumentului regiunii din care a fost transplantat dermul.

Activitatea fibroblastelor este puternic influențată de hormoni. Sub acest aspect fibroblastul este considerat o *celulă hormonosensibilă*. Astfel se știe că unii hormoni ca hidrocortizonul și ACTH-ul inhibă sinteza de precursori proteici fibrilari (procolagen și proelastină), împiedicînd procesele de cicatrizare. Datorită efectului de inhibare a sintezei de precursori fibrilari, cortizonul este utilizat în tratamentul bolilor de colagen (artrita reumatismală, lupusul eritematos, poliarterita nodoasă); el împiedică tendința de fibrozare cicatriceală existentă în aceste afecțiuni. STH-ul stimulează proliferarea fibroblastelor și sinteza de colagen. Tiroxina scade mitozele fibroblastului iar hormonii sexuali stimulează proliferarea fibroblastică (testosteronul) sau activitatea de sinteză a precursorilor din substanța fundamentală (estrogenii). Fibroblastele unor organe hormonosensibile cum sînt cele din uter, trompe uterine, ovare, suferă modificări metabolice în raport cu momentul funcțional al acestora.

Activitățile fibroblastelor pot suferi *alterări* în unele afecțiuni endocrine sau de altă natură. Astfel în unele maladii tiroidiene, ca mixedemul, apar sinteze crescute de glicozaminoglicani, în timp ce tireotoxicoza reduce activitatea de sinteză a fibroblastelor. În acromegalie cresc indicele de proliferare fibroblastică, precum și activitatea de sinteză a acestor celule. Alți factori care influențează activitatea de secreție a fibroblastelor sînt vitaminele. Astfel eficiența de vitamină C duce la apariția unei boli degenerative a țesutului conjunctiv denumită scorbut. Se știe că în lipsa vitaminei C, fibroblastele sînt incapabile să sintetizeze molecule de procolagen, întrucît vitamina C este un cofactor pentru procolagen-prolinhidroxilaza, enzimă implicată direct în hidroxilarea reziduurilor de prolină care intră în constituția moleculei de procolagen. În deficiența marcată de vitamină C (avitaminoza C), fibrele de colagen îmbătrînite sau uzate prin hiperfuncție nu mai pot fi înlocuite. Aspectul

Scanned with OKEN Scanner

degenerativ se manifestă clinic în special în zonele în care *turnover*-ul colagenului este în mod normal foarte rapid. Așa se explică de ce în scorbut dinții se mobilizează și cad: în ligamentul periodontal care fixează dintele în alveolă, fibrele conjunctive se degradează și nu mai pot fi înlocuite.

În hipoproteinemie fibroblastele nu se maturează și nu desfășoară sinteză de colagen. Hiperlipemia și ateroscleroza determină inhibarea sintezei de colagen și încărcarea cu lipide a fibroblastelor. Inflamația este însoțită de creșterea sintezei unor glicozaminoglicani cu rol protector în matricea extracelulară și de creșterea sintezei de colagen care organizează fibre subțiri.

5.2.2. MASTOCITUL (BASOPHILUS TEXTUS)

Mastocitul este o celulă localizată în țesuturile conjunctive, în special de-a lungul vaselor. Celula poate fi prezentă în orice tip de țesut conjunctiv, cu variații numerice de la un organ la altul dar mai abundentă în derm și căile respiratorii.

5.2.2.1. Originea mastocitelor

Originea mastocitelor a fost mult discutată. Pe baza asemănărilor morfologice și chimice, ele au fost considerate la început ca bazofile sanguine modificate și migrate din patul vascular în țesuturile conjunctive. Conținutul granular al celor două tipuri de celule, precum și mecanismul de eliberare a mediatorilor sînt asemănătoare. În acest sens există părerea că mastocitul, care în mod normal nu se află în sîngele circulant ci în țesuturile conjunctive, ar lua naștere din aceeași clonă ca și celulele sanguine, avînd deci precursori în măduva roșie hematogenă. Mai documentată apare ipoteza conform căreia mastocitul ia naștere din celulele mezenchimale la embrion și făt. La adult ele își au originea în celulele mezenchimale cantonate în jurul vaselor. După diferențiere, ele își mențin capacitatea de proliferare și prin *self*-replicare asigură linia celulară mastocitară (fig. 5.4).

De formă ovalară sau neregulat-colțuroasă (vezi fig. 5.4), diametrul mastocitului se situeaază între 15 și 20 micrometri. Nucleul este rotund, situat central, bogat în heterocromatină. Citoplasma este săracă în organite celulare, mitocondriile sînt rare, complexul Golgi slab dezvoltat, RER redus,

Fig. 5.4. — Mastocit (imagine la microscopul electronic × 2 000).

Scanned with OKEN Scanner

ribozomii puțini. În schimb citoplasma conține numeroase granule cu diametrul de 1—2 micrometri. Ele se evidențiază cu albastru de toluidină care le colorează metacromatic în roșu-purpuriu. Fenomenul de metacromazie se datorește numeroaselor grupe acide din structura componenților granulari. Cea mai mare parte din granulele mastocitare sînt puternic metacromatice și slab PAS-pozitive și numai un număr mic dintre ele sînt ortocromatice și intens PAS-pozitive. Ultrastructural, granulațiile apar cu un conținut lamelar concentric sau granular. Foarte deseori în aceeași granulă, matricea granulei are un aspect combinat, lamelar periferic și granular central. Fiecare granulă este delimitată de o endomembrană subțire (fig. 5.5).

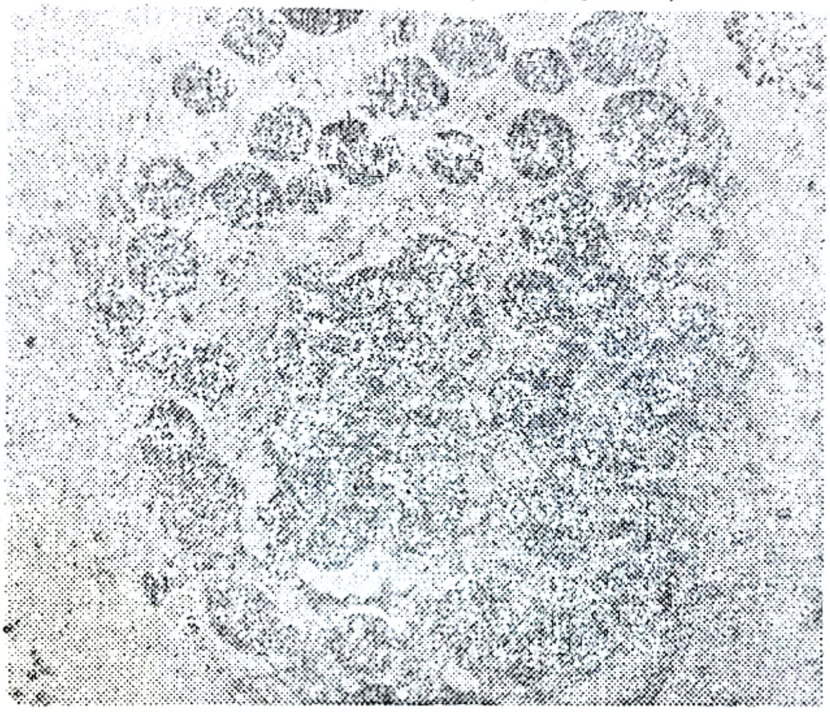


Fig. 5. 5. — Mastocit (imagine la microscopul electronic × 5 500).

Suprafața externă a mastocitului conține receptori specifici pentru IgE. Impactul anumitor antigeni din mediul extracelular cu acești receptori duce la formarea unor complexe antigen-anticorp la suprafața membranei și, ca urmare, la apariția fenomenului de degranulare mastocitară, de eliberare a produșilor din granule în matricea extracelulară. În afară de impactul suprafeței mastocitare cu diferite tipuri de antigeni, fenomenul de degranulare mastocitară mai poate fi determinat de unii agenți fizici (căldură), mecanici (comprimare) sau de factori chimici denumiți și eliberatori de heparină (morfină, cofeină). În sens invers, degranularea mastocitară poate fi împiedicată de unele droguri ca izoproterenol sau teofilină, care acționează crescînd concentrația de AMP ciclic în mastocite sau de citochalazină care inhibă activitatea microfilamentelor din matricea celulară.

5.2.2.2. Funcția

Funcția mastocitului rezidă în capacitatea granulelor mastocitare de a depozita o serie de mediatori chimici cum sînt: heparina, histamina, factorul chemotactic pentru eozinofile, substanța reactivă în șocul anafilactic.

Heparina constituie 4% din greutatea uscată a granulelor mastocitare. Datorită prezenței ei în celulă, mastocitul a mai primit și denumirea de „he-

Scanned with OKEN Scanner

parinocit". Heparina, un glicozaminoglican sulfatat, este depozitată temporar în granulele mastocitare, unde stabilește legături labile cu moleculele structurale granulare și cu histamina. Ea are rol anticoagulant. Eliberată din granulele mastocitare, heparina acționează și ca factor antilipemic, întrucît determină activarea lipoproteinlipazei (este cofactor al enzimei).

Histamina, derivat al histidinei, este rapid eliberată din granulele mastocitare în diferite infecții locale sau în unele reacții imunologice. Ea determină în matricea extracelulară dilatarea vaselor sanguine pe plan local, crește permeabilitatea peretelui venelor mici, prin contracția celulelor endoteliale, ceea ce determină desfacerea joncțiunilor strînse dintre acestea, creîndu-se astfel spații largi care facilitează accesul apei, al serum-proteinelor (anticorpi, complement), al microfagelor la locul leziunii. Ea determină și contracția mușchiului neted, în special a celui din bronhiole.

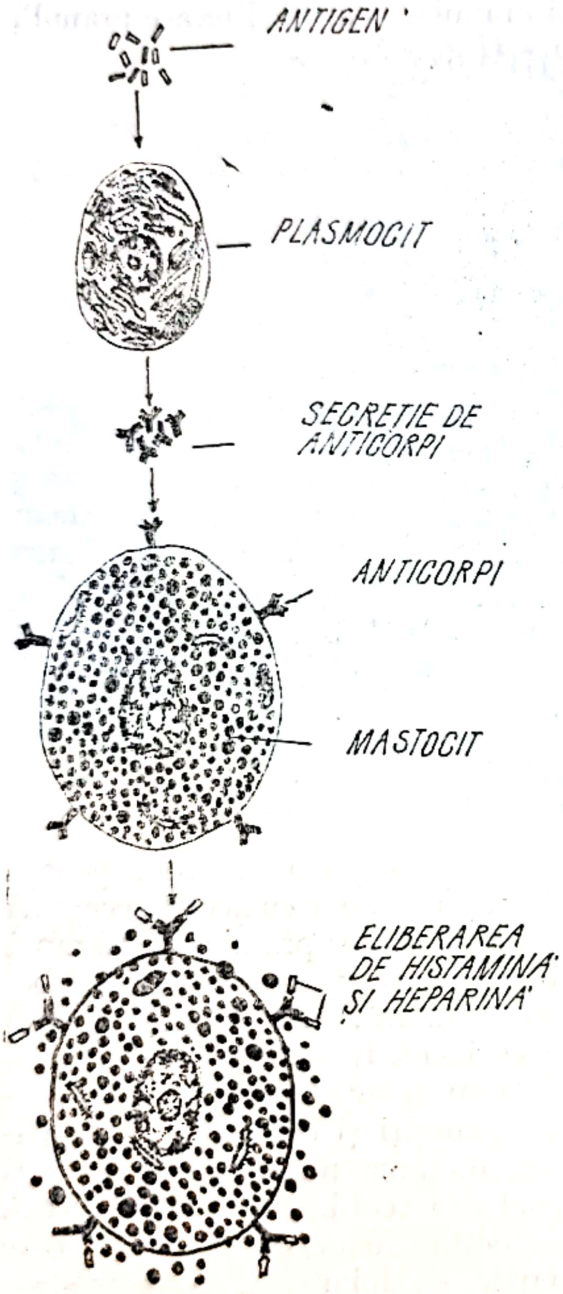


Fig. 5.6. — Secvențele care conduc la eliberarea factorilor activi din mastocit.

Factorul chemotactic pentru eozinofile din anafilaxie (*eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*) este un alt mediator chimic eliberat de mastocite, alcătuit din două tetrapeptide, care atrag eozinofilele din sînge în țesuturile conjunctive la locul degranulării mastocitare. Prin enzimele pe care le conțin și prin prostaglandine, eozinofilele intervin în inactivarea histaminei și a altor substanțe eliberate în timpul degranulării mastocitare.

Serotonina (5-hidroxitriptamina) este sintetizată și secretată de către mastocitele animale, dar nu și la om. Ea acționează asupra mecanismului musculaturii netede din peretele vascular sau a celei din căile respiratorii producînd vaso- și bronhoconstricție.

Substanța reactivă în anafilaxie (*slow reactive substance of anaphylaxis*) este sintetizată și eliberată de mastocite numai în cazul șocului anafilactic. Această substanță produce contracții ale mușchiului neted din căile aeriene fiind responsabilă de apariția fenomenului de asfixie din șocul anafilactic.

La om mastocitele sînt implicate în reacțiile alergice de hipersensibilitate imediată — de exemplu în astm, urticarie, alergie, șoc anafilactic. În aceste cazuri, la un prim impact cu un anumit tip de antigeni (alergeni), plasmocitele secretă IgE care se fixează de receptorul IgE de la suprafața mastocitară. La un nou contact, antigenul formează complexe antigen-anticorp pe membrana celulară a mastocitelor (fig. 5.6). Ca urmare, apare lezarea membranei și eliminarea

Scanned with OKEN Scanner

fie a granulelor, fie a conținutului lor în mediul extracelular. Mediatorii chimici din granule acționează specific ducînd la apariția semnelor clinice caracteristice reacțiilor de hipersensibilitate imediată: edem, durere, febră, șoc. Cunoscută în sensul celor afirmate este secvența evenimentelor care apar în șocul anafilactic produs de repetarea vaccinului antitetanic: la prima administrare a vaccinului, în contact cu antitoxina tetanică, limfocitul B se transformă în plasmocit care secretă cantități mari de IgE. Aceasta se fixează la suprafața membranei mastocitare, pe receptorii IgE. La a doua administrare, antitoxina cu rol de antigen formează complexe antigen-anticorp cu IgE de la suprafața mastocitelor și, ca urmare, apare degranularea mastocitară. Eliberarea conținutului granulelor în mediul extracelular induce apariția fenomenelor clinice deosebit de grave, adesea letale, care apar în șocul anafilactic.

5.2.3. MACROFAGELE (MACROPHAGOCYTUS)

Macrofagele sînt o varietate de celule conjunctive tot atît de numeroase ca și fibroblastele sau chiar mai numeroase în țesuturile conjunctive puternic vascularizate. Ele se întîlnesc în toate tipurile de țesut conjunctiv, dar sînt localizate cu precădere în apropierea contactului cu mediul extern: corionul organelor cavitare, în jurul vaselor, în dermul pielii sau în stroma organelor parenchimatoase.

5.2.3.1. Originea macrofagelor

Iau naștere din celulele stem din măduva hematogenă care se diferențiază în precursori ai monocitelor medulare. Din compartimentul medular, monocitele trec în sînge, unde rămîn cca 60 ore, apoi, prin diapedeză, ajung în țesutul conjunctiv unde se transformă în macrofage tisulare și își desfășoară activitățile specifice. Faptul că macrofagele nu apar în țesutul conjunctiv decît după ce a fost vascularizat, confirmă originea lor medulară.

Durata de viață a macrofagelor în țesutul conjunctiv este de cîteva luni, iar capacitatea lor de proliferare depinde direct de necesitățile organismului. În condițiile normale populația de macrofage este menținută în principal prin *self*-replicare; rezultă noi celule, care mai poartă și denumirea de *histiocite*. O parte din macrofagele tisulare provin prin aport de monocite sanguine. Capacitatea de proliferare a macrofagelor este stimulată de substanțe secretate de limfocitele T, aspect important în procesele imunologice.

În unele circumstanțe patologice, ca răspuns la pătrunderea în organism a unor microbi (în lepră sau tuberculoză) sau a unor corpi străini, macrofagele pot fuziona, dînd naștere la *celule gigante multinucleate*. Ele au 20—50 de nuclei cuprinși într-o masă citoplasmatică unică. În alte cazuri, în jurul unor focare de infecție ele se agregă și se unesc prin joncțiuni strînse. Întrucît se aseamănă cu celulele epiteliale, mai poartă denumirea de *celule epitelioide*.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.3.2. Particularități morfologice

Macrofagele au diametrul cuprins între 15 și 50 micrometri, dimensiune direct dependentă de activitatea lor funcțională. Macrofagele mici sînt inactive, în timp ce cele mari sînt deosebit de active. Forma lor este rotundă sau ovalară și prezintă prelungiri scurte. Nucleul macrofagului este relativ mic, așezat central sau excentric, rotund sau cel mai adesea reniform. Cromatina este heterocromatică iar nucleolii se disting greu (fig. 5.7.).

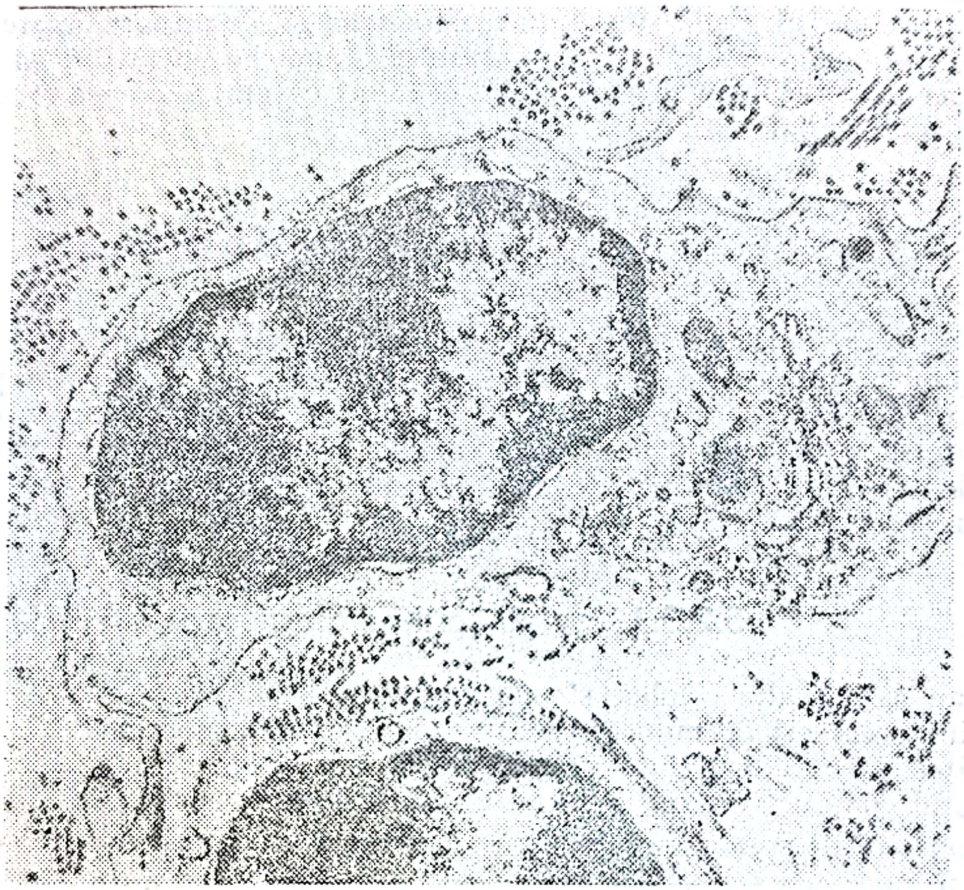


Fig. 5.7. — Macrofag (imagine la microscopul electronic × 5 500).

Citoplasma abundentă conține organite celulare numeroase, dintre care un aparat vacuolar bine dezvoltat (fagozomi, lizozomi primari, secundari). Prezența lizozomilor secundari este responsabilă de aspectul spumos (*foamy*), caracteristic macrofagului. Acest aspect este mai evident la macrofagele foarte active (fig. 5.8). În citoplasmă se găsesc de asemenea numeroase microfilamente alcătuite în principal din molecule de actină (100 de molecule de actină pentru o moleculă de miozină). Ele intervin atît în procesele de deplasare a macrofagelor cît și în formarea de pseudopode necesare asigurării funcției de fagocitoză sau de înlesnire a fuziunii lizozomilor primari cu fagozomii.

Membrana celulară examinată la microscopul de *scanning* prezintă numeroase prelungiri în deget de mănușă. La suprafața ei glicocalixul, extrem de

Scanned with OKEN Scanner

bine dezvoltat, prezintă receptori pentru regiunea Fc a imunoglobulinei G (receptori Fc), precum și receptori pentru imunoglobulina M și cel de al treilea component al complementului (receptori C_3'). Se apreciază că macrofagul foarte activ poate prezenta pe suprafața sa circa 8 milioane de receptori.

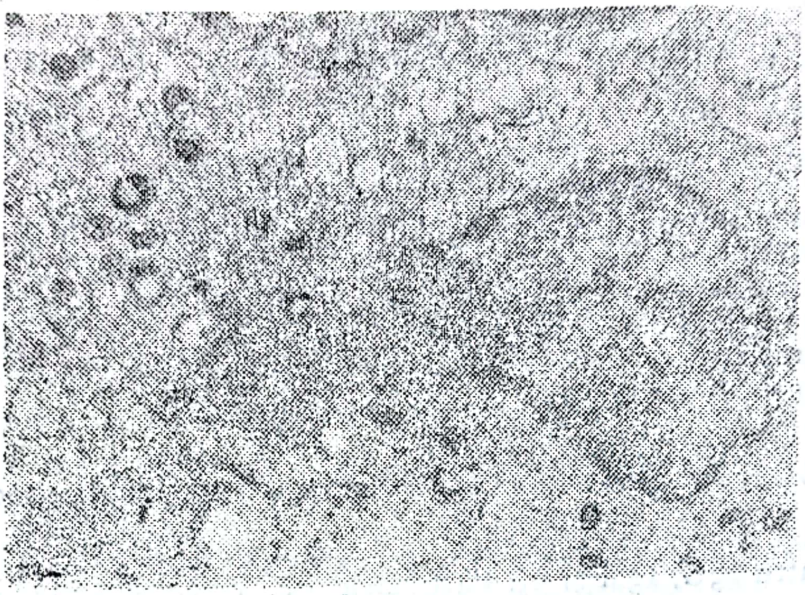


Fig. 5. 8. — Macrofag activ (imagine la microscopul electronic × 4 200).

5.2.3.3. Citofiziologia macrofagelor

Proprietățile fundamentale ale macrofagelor sînt: mobilitatea, capacitatea de fagocitoză și cea de secreție.

Extrem de mobile, macrofagele se deplasează în țesuturi cu ajutorul vălurilor și expansiunilor citoplasmatice care formează adevărate pseudopode. Mobilitatea spontană a macrofagului poate crește sub acțiunea unor factori chemotactici, dintre care mai importanți sînt factorii C_5', unele toxine bacteriene, proteine denaturate. Se cunosc și factori care imobilizează macrofagele la locul invaziei antigenice, în special cei secretați de limfocitele activate și care permit reținerea macrofagelor la locul de conflict în reacțiile de apărare.

Fagocitoza, proprietate fundamentală a macrofagelor, este declanșată de impactul suprafeței celulare cu un antigen de natură diferită. Prin fagocitoză sînt îndepărtate din țesuturi o gamă foarte largă de particule ca: microorganisme, complexe imune multimoleculare, resturi organice etc. Macrofagul este considerat gunoierul țesutului conjunctiv. Fagocitoza este de două feluri: specifică și nespecifică.

Important pentru realizarea funcției de fagocitoză specifică este faptul că macrofagele recunosc particulele pe care urmează să le înglobeze, proces denumit și *recunoaștere fagocitară*. Prin recunoaștere fagocitară, macrofagul diferențiază microorganismele sau resturile tisulare, de materialele endogene normale. Recunoașterea fagocitară se realizează la două niveluri: la *nivel tisular*, cu ajutorul factorilor de recunoaștere denumiți *opsonine*, și la *nivel celular*, prin *receptori* de pe suprafața macrofagelor. Opsoninele pot fi neimu-

nospecifice — ca fibronectina — și imunospecifice — ca anticorpii de tipul IgG, IgM, precum și cea de a treia fracțiune a complementului. Ele învelesc particulele care urmează să fie fagocitate, procesul respectiv de învelire purtînd denumirea de *opsonizare*. La nivel celular se descriu trei tipuri de receptori care recunosc particulele acoperite de fibronectină, IgG, IgM sau C'_3.

5.2.3.3.1. Fagocitoza specifică neimunologică sau neimunospecifică

Fagocitoza specifică neimunolopică sau neimunospecifică este mediată de receptori pentru fibronectină. În acest caz particula endogenă alterată sau de origine exogenă este opsonizată cu molecule de fibronectină. Ca o consecință, apar modificări fizico-chimice in molecula de fibronectină, care astfel este recunoscută de receptorii respectivi. Interacțiunea dintre fibronectina alterată cu receptorii de pe suprafața macrofagului, determină atașarea particulei la membrana macrofagului și declanșarea fagocitozei. În țesutul conjunctiv fibronectina mediază fagocitarea de colagen denaturat, fibrină, fibrinogen, trombocite.

5.2.3.3.2. Fagocitoza specifică imunologică sau imunospecifică

Fagocitoza specifică imunologică sau imunospecifică este mediată de receptori pentru IgG, IgM și C'_3. Particulele antigenice sînt învelite pe toată suprafața cu opsonine de tip IgG sau IgM și C'_3, care apoi sînt recunoscute de receptorii de la suprafața macrofagelor. Receptorii interacționează cu o anumită porțiune din IgG, și anume cu fragmentul Fc; de aici derivă denumirea de receptor Fc pentru categoria de receptori care atașează complexele antigen-anticorp. Receptorii C'_3 recunosc și atașează particulele opsonizate cu IgM și C'_3. Fagocitoza poate fi considerată răspunsul suprafeței celulare la semnalul generat de contactul dintre particulele opsonizate cu receptorii de membrană.

Fagocitoza mediată de receptori apare numai la macrofagele tisulare denumite „de profesie". Ea trebuie deosebită de fagocitoza nespecifică sau nemediată de receptori, în care unele materiale inerte sau chiar bacterii pot fi înglobate în absența factorilor de recunoaștere. În aceste cazuri apar interacțiuni nespecifice electrostatice sau hidrofobe între aceste particule și suprafața externă a macrofagelor. Un astfel de exemplu este dat de macrofagele alveolare care înglobează din aerul inspirat unele particule inerte, cum ar fi: cărbunele, siliciul, beriliul, azbestul, celuloza, scame de bumbac și alți poluanți industriali. Un caz mai special îl reprezintă fagocitoza celulelor tumorale de către macrofagele tisulare, proces care poate împiedica dezvoltarea tumorilor sau a metastazelor tumorale. Procesul nu pare să depindă de factori imunologici și se bazează pe recunoașterea unor componenți din suprafața celulelor tumorale considerate de către organism *non self*.

Etapele fagocitozei. Particulele antigenice se atașează de suprafața membranei celulare, atașare ce poate fi ori mediată de receptori, ori consecutivă unor interacțiuni specifice. După atașare, macrofagul trimite pseudopode care înconjură particula. Prin unirea capetelor acestor pseudopode se formează o veziculă denumită fagozom (endozom), care se deplasează în citoplasmă cu ajutorul mișcărilor microfilamentelor. Fagozomul fuzionează cu lizozomii primari, formînd lizozomi secundari de tipul fagolizozomilor.

Scanned with OKEN Scanner

La nivelul acestora, particulele sînt degradate cu ajutorul hidrolazelor acide lizozomale. Ceea ce nu poate fi digerat, rămîne depozitat în lizozomii secundari, care capătă denumirea de corpi denși și care sînt exocitați. În bolile lizozomale, boli de depozit, datorită unui defect genetic de sinteză a uneia sau a mai multora din enzimele hidrolitice acide, produșii ce nu pot fi digerați prin lipsa acestor enzime, se depun în macrofage.

Activarea macrofagului este realizată prin sporirea capacității de ingerare a diferitelor particule din mediul extracelular și apare sub efectul diferiților stimulatori ai fagocitozei. Cel mai adesea activarea macrofagică apare în infecții ale organismului cu diferite tipuri de microorganisme care stimulează secreția de limfokine de către limfocitul T. Sub efectul limfokinelor, macrofagul crește ca volum, organitele celulare devin mai abundente. în special elementele aparatului vacuolar. Suprafața celulară devine neregulată datorită multiplicării expansiunilor citoplasmatice și a pseudopodelor. La suprafața ei numărul de receptori pentru IgG și C_3' crește considerabil. Sub acțiunea limfokinelor, macrofagele activate sînt capabile să înglobeze și să distrugă orice tip de antigen fără recunoaștere imunologică. Ea apare deosebit de importantă în imunoterapia anticanceroasă.

Blocada macrofagelor se referă la prăbușirea funcției de fagocitoză a macrofagelor, care poate fi indusă de o serie de substanțe fagocitostabile de tipul particulelor de coloid. Gradul de inhibare a funcției fagocitice prin agenți capabili să inducă blocada nu este uniform în toate macrofagele din țesutul conjunctiv. Ea apare mai crescută în compartimenele cele mai vascularizate. În general, după blocadă, funcția fagocitară revine la normal și devine chiar exacerbată.

În organism, *modularea* funcției de fagocitoză a macrofagelor poate fi realizată prin factori care activează sau inactivează fagocitoza. Activatori cunoscuți sînt endotoxinele bacteriene, estrogenii, unii viruși, iar între factorii de inactivare sînt incluși șocul traumatic, septicemia, bolile neoplazice, iradierile cu raze X.

Macrofagele sînt capabile *să secrete* în mediul extracelular diferite substanțe ca: fracțiuni proteice ale complementului (C_2' și C_4'), proteine pirogene care determină apariția febrei, interferoni, enzime ca elastaza, colagenaza, lizozimul, activator al plasminogenului, factori care stimulează creșterea numărului de colonii hemopoietice în măduva roșie hematogenă.

Funcțiile macrofagului din țesuturile conjunctive sînt comune cu ale celorlalte macrofage din organism, incluse într-un sistem denumit „sistemul fagocitelor mononucleare". Acest sistem grupează ansamblul macrofagelor și al celulelor derivate din ele, care — alături de limfocite și plasmocite — alcătuiesc celulele sistemului imunitar. Termenul înlocuiește vechea denumire de sistem reticulo-endotalial. În acest sistem se disting trei compartimente celulare: compartimentul medular, sanguin și tisular.

Compartimentul medular cuprinde ansamblul celulelor care proliferează în măduva osoasă, plecînd de la celula stem hemopoietică pluripotentă *(noncommited)* și se diferențiază în monocite. În acest compartiment intră celula stem determinată pentru diferențiere în această direcție *(commited)*, dar încă nediferențiată, monoblastele, promonocitele, monocitele medulare.

Compartimentul sanguin cuprinde monocitele sanguine, care reprezintă forma circulantă sau de distribuire a macrofagelor din organism.

Scanned with OKEN Scanner

Compartimentul tisular este reprezentat de monocitele migrate în țesuturi și diferențiate în macrofagele tisulare. Aceste macrofage tisulare se grupează în două categorii: macrofage *libere* și macrofage *fixe*. Macrofagele libere sînt diseminate în organism și se găsesc în țesutul conjunctiv lax (unde poartă numele de histiocite), în cavitățile seroase (macrofagele pleurale și peritoneale), în alveolele pulmonare (macrofagele alveolare), în organele limfo- și hematopoietice (măduva osoasă, ganglionul limfatic, splină), în sistemul nervos central (microglia). Macrofagele fixe sînt imobilizate în unele organe unde îndeplinesc un rol local specific. În acestă categorie intră macrofagele din foliculii limfoizi, macrofagele fixe din splină, macrofagele fixe din ficat (celulele Kupffer din sinusoidele hepatice).

Toate macrofagele cuprinse în sistemul fagocitelor mononucleare prezintă aceleași particularități morfologice, sînt activate sub efectul diferitelor stimulări pentru fagocitoză specifică, mediată de receptori și joacă un rol important în procesele de apărare a organismului, prin curățirea nespecifică a țesuturilor și participînd la reacții imune. Curățirea nespecifică a țesuturilor se realizează prin fagocitoză, toate macrofagele acționînd ca „gunoieri" ai organismului pe care îl debarasează de materiale străine (bacterii, ciuperci, paraziți, particule inerte etc.) și autohtone (hematii îmbătrînite, celule uzate, complexe macromoleculare de natură diferită.).

În reacțiile imune rolul macrofagelor este foarte important, în special la începutul și sfîrșitul reacției imune. La începutul reacției imune macrofagul captează antigenul, îl fixează pe suprafață și îl lasă în contact pentru lungi perioade de timp cu limfocitele, pe care le stimulează în generarea răspunsului imun. La sfîrșit, macrofagele atrase de unele substanțe secretate de limfocite în focarele invadate de antigene, le fagocitează și le distrug. Uneori particulele fagocitate sînt degradate numai parțial iar fracțiunea antigenică cea mai virulentă este eliminată în mediul extracelular. Crescînd antigenitatea diferitelor substanțe, macrofagele stimulează și în acest fel limfocitele în răspunsul imun.

În afară de procesele de apărare, prin capacitatea lor de fagocitare specifică, macrofagele intervin în reglarea hematopoiezei (prin distrugerea hematiilor), în degradarea pigmenților biliari, în metabolismul lipidic (prin degradarea complexelor lipoproteice).

5.2.4. PLASMOCITUL (PLASMOCYTUS)

Plasmocitele sînt celulele conjunctive mai răspîndite în țesuturile conjunctive din mucoasele organelor cavitare sau apar în număr foarte mare în cazul unor inflamații cronice. Ca origine, iau naștere din limfocitul B după stimulare antigenică. Ele nu apar în țesutul conjunctiv decît după naștere, cînd organismul ia contact cu antigenii.

5.2.4.1. Particularități morfologice

Plasmocitul este o celulă de talie mare, pînă la 20 micrometri, de formă rotundă sau ovalară (fig. 5.9). Nucleul, rotund sau oval, este caracterizat prin așezarea sa excentrică și prin dispunerea heterocromatinei în bulgări radiari, sub forma unor spițe de roată sau cu aspectul unui cadran de ceasor-

Scanned with OKEN Scanner

nic. Citoplasma este abundentă, intens bazofilă, conține un reticul endoplasmic rugos, foarte dezvoltat, cu cisterne mărginite de numeroși ribozomi (fig. 5.10). Prezența reticulului rugos foarte dezvoltat face ca citoplasma să se coloreze puternic cu pironină, de unde și denumirea de „celula pironinofilă a țesutului conjunctiv". Pe alocuri, în cisternele reticului rugos sînt acumulate cantități mari de produși de secreție, reprezentați prin proteine de-

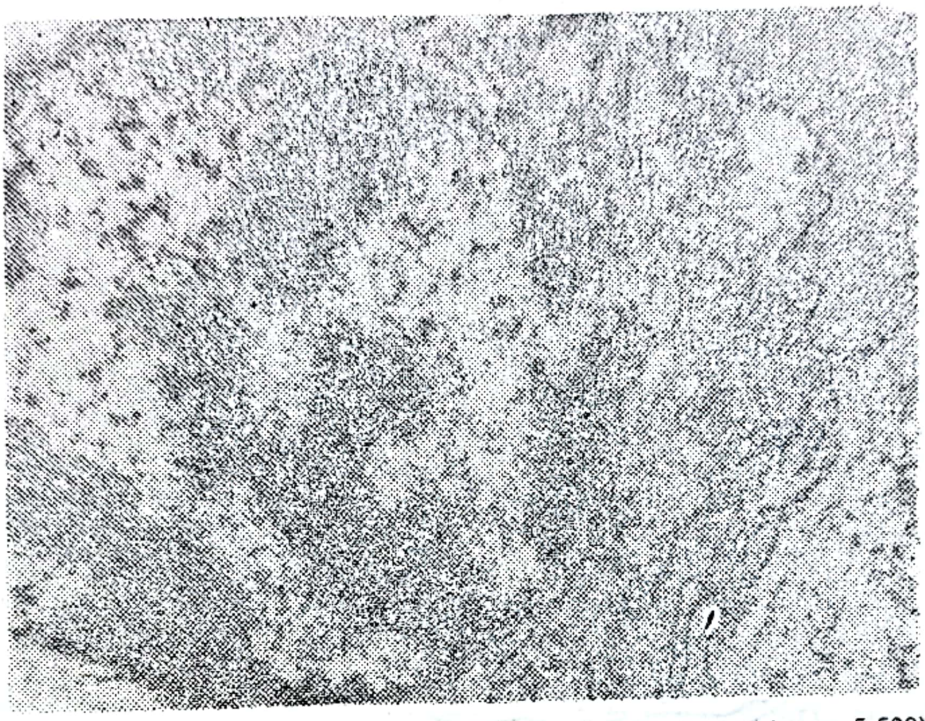


Fig. 5. 9. — Plasmocit (imagine la microscopul electronic × 5 500).

Fig. 5. 10. — Plasmocit activ (imagine la microscopul electronic × 18 000).

Scanned with OKEN Scanner

naturate. Ele se colorează acidofil și apar sub forma unor corpusculi denumiți corpusculi Russell. În jurul nucleului complexul Golgi este foarte dezvoltat și zona perinucleară apare luminoasă (haloul clar perinuclear) (fig. 5.11).

Rolul plasmocitului este de a sintetiza și secreta toate tipurile de imunoglobuline din organism. Astfel el intervine activ în procesele imunologice ale organismului.

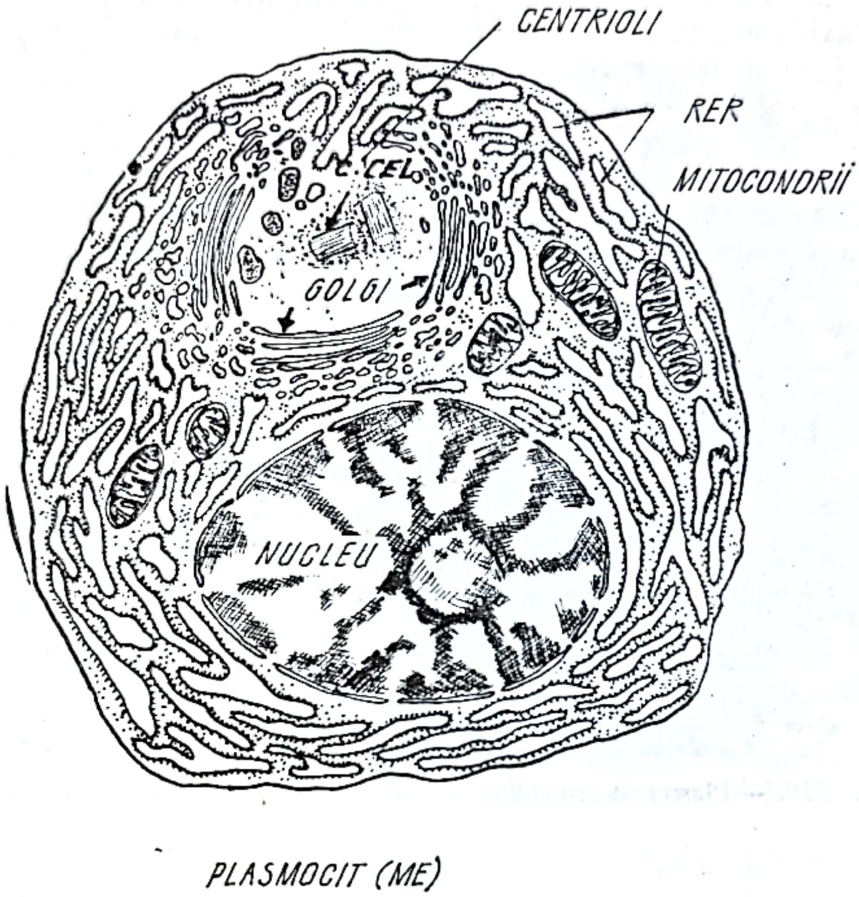


Fig. 5. 11. — Schema organizării ultrastructurale a plasmocitului activ.

5.2.5. LEUCOCITELE

Diferite tipuri de leucocite migrează în matricea conjunctivă intercelulară, traversînd pereții capilarelor și ai venulelor. Pot fi observate leucocite polimorfonucleare (neutrofile, eozinofile, bazofile), limfocite T și limfocite B. Numărul leucocitelor în țesuturile conjunctive crește în procesele inflamatorii.

5.2.6. CELULA ENDOTELIALĂ

Așezate pe un singur rînd, celulele endoteliale delimitează lumenul vaselor sanguine și limfatice. Ele prezintă polaritate funcțională și poziționalã, avînd o față luminală scăldată de sîngele circulant, una tisulară scăldată de fluidul tisular și două fețe laterale prin care vin în contact unele cu altele.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.6.1. Particularităţi morfologice

Celula endotelială are formă poliedrică, diametrul de 25—40 micrometri şi grosimea de 0,1—0,5 micrometri. Nucleul este alungit şi tahicromatic, orientat paralel cu axul lung al vasului. Membrana celulară prezintă particularităţi în funcţie de polaritatea poziţională a celulei. Pe faţa luminală, scăldată de plasmă, membrana prezintă un glicocalix gros de 15—40 nanometri. La nivelul ei s-a pus în evidenţă o gamă largă de molecule ca: glicozaminoglicani, glicoproteine, glicolipide şi sialoconjugaţi. În această zonă membrana este acoperită, pe frontul luminal, de o peliculă formată din proteine plasmatice adsorbite la suprafaţă din sîngele circulant. Dintre acestea fac parte: alfa-2-macroglobulina, un inhibitor proteazic, lipaza, heparina, fibrina sau fibrinogenul, albumina. Datorită încărcăturii negative a membranei şi structurii ei moleculare specifice, celulele endoteliale indemne sînt netrombogene, împiedicînd aderarea trombocitelor sau a celulelor sanguine la suprafaţa luminală. Ea prezintă receptori specifici care reţin o serie de molecule ce urmează să fie ori metabolizate de către celulele endoteliale, ori transportate spre frontul tisular. Dintre acestea fac parte lipoproteinele cu densitate mică, angiotensina, insulina, serotonina, epinefrina şi norepinefrina, acetilcolina, histamina, trombina. Membrana frontului tisular, ce vine în contact cu lamina bazală, este groasă de 5—8 mm; ea participă la sinteza colagenului tip IV şi V, glicoproteinelor, lamininei, fibronectinei, entactinei, care intră în organizarea ei. Membranele laterale ale celulei endoteliale stabilesc contacte cu cele învecinate prin dispozitive joncţionale de tip *occludens* şi *gap*. În vasele mari, pe lîngă acestea se găsesc şi joncţiuni de tip desmozomal. *Matricea celulară* conţine organite comune, concentrate perinuclear (regiunea organitelor). Acestea sînt reprezentate prin mitocondrii, complexul Golgi, reticulul endoplasmic bine dezvoltat, lizozomii primari şi secundari, corpi denşi şi multiveziculari. Sînt prezente de asemenea granule caracteristice, groase de aproximativ 0,1 nanometri şi lungi de 3 nanometri, descrise de Weibel şi Palade în celulele endoteliale din artere, mai puţin în cele din vene, şi absente în capilare. Corpii respectivi conţin factorul von Willebrand, o glicoproteină cu greutate moleculară de aproximativ 260 000 şi structură complexă multimerică, realizată prin legături disulfidice între monomeri. Matricea celulară conţine mai multe subclase de filamente intermediare, de aproximativ 10 nm diametru, în care predomină vimentina. Mai conţine mici filamente de actină, de aproximativ 7 nm diametru, şi filamente groase de miozină cu diametrul de 15 nm. Sînt prezenţi de asemenea şi microtubuli. În unele celule endoteliale — de exemplu cele întîlnite în arteriolele uterine, cerebrale şi în aortă — matricea celulară conţine fibrile care prezintă striaţii transversale periodice, cu rol în vasoconstricţie.

Se mai observă mici vezicule singulare sau dispuse în lanţuri, care pot forma, prin fuziune, *canale transendoteliale* (Simionescu N. şi colab. — 1971, 1985). La locul de fuziune a acestor vezicule, pot fi observate stricturi de 20—40 nanometri, acoperite de diafragme. Ele ar reprezenta căi hidrofile active, care pot funcţiona ca pori mici sau mari, cu dinamica reglată de stricturile şi diafragmele lor. În unele celule endoteliale, cum sînt cele din capilarele viscerale, pot apărea, pe lîngă vezicule sau canale transcelulare, şi pori sau ferestre intracitoplasmatice cu diametrul de aproximativ 60—80 nm, uneori acoperite de o diafragmă.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.6.2. Funcții

Sub aspect *funcțional* celulele endoteliale sînt puternic diferențiate, în vederea efectuării procesului de schimb bidirecțional de substanțe între două compartimente fluide reprezentate de plasmă și lichidul interstițial. Schimburile de substanțe între cele două medii au loc în principal prin procesul de endocitoză și exocitoză. Endocitoza se efectuează fie prin fagocitoză, fie prin pinocitoză (fluidă sau adsorbantă, mediată de receptori). *Transcitoza* reprezintă o varietate de endocitoză cuplată cu exocitoza, prin care molecule de natură foarte diferită sînt preluate pe o față a membranei și eliminate pe fața opusă. Procesul presupune înglobarea unor mici molecule, prin pinocitoză în faza fluidă, în mici vezicule care fie traversează celula și se deschid pe frontul interstițial sau sanguin, fie că fuzionează organizînd canale care permit transportul rapid de particule de pe o față pe alta. Transcitoza pare a fi principala activitate a celulelor endoteliale din capilare și venule postcapilare, în timp ce celelalte forme de endocitoză sînt mai bine reprezentate în celulele endoteliale din sinusoide. O altă funcție a celulelor endoteliale este aceea de a sintetiza steroli, din care o parte sînt distribuiți propriei plasmaleme (fig. 5.12). Ample cercetări efectuate de Simionescu N. și colab. (1975, 1985) au arătat că membrana celulelor endoteliale împreună cu cea a veziculelor canalelor și cu ferestrele din citoplasma celulelor endoteliale, deși în general identice structural, conțin *„microdomenii" diferențiate prin încărcare anionică datorită prezenței unor glicozaminoglicani, sialoconjugați și prin reziduuri monozaharidice.* Membrana de suprafață are încărcătură negativă, diafragmele orificiilor fenestrate sînt încărcate negativ, în timp ce diafragmele veziculelor și canalelor transcelulare sînt neutre. Glicoproteinele sînt repartizate astfel: lectinele pe toată plasmalema, iar radicalii beta-D-galactozil și beta-N-acetil-D-glucozaminil, în veziculele și canelele transendoteliale precum și în diafragmele lor. Diafragmele fenestrațiilor conțin o cantitate mare de heparan-sulfat, ele nu au monozaharide sau au foarte puține. Anulii fenestrațiilor, structuri stabile în porii intracelulari, sînt bogați în colesterol.

O altă funcție a celulelor endoteliale este aceea de *a se contracta*. Această funcție se datorează existenței în citoplasma lor a unui număr apreciabil de

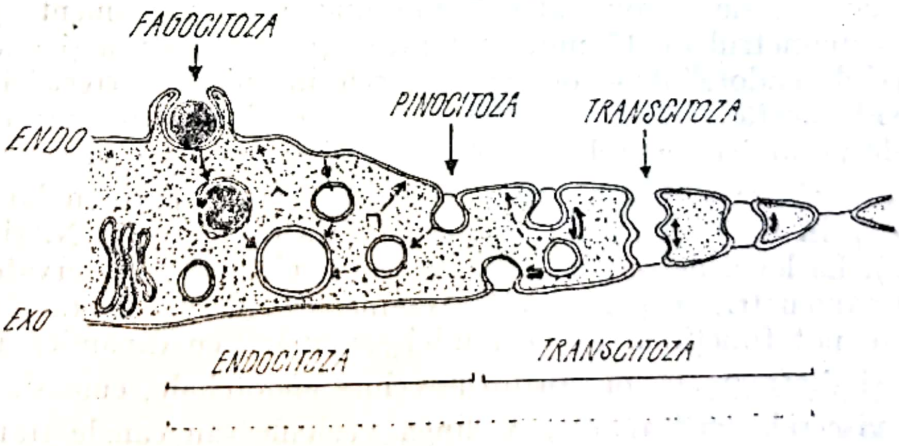


Fig. 5.12. — Schemă reprezentînd căile de transport (endocitoza și transcitoza) prin celula endotelială (după Simionescu N. și colab.).

Scanned with OKEN Scanner

fibre de stres, ce reprezintă de fapt microfilamente de actină și miozină. Modificările continue prin contracția celulelor endoteliale sînt destinate a regla lumenul vasului și a asigura o dinamică circulatorie normală.

Celulele endoteliale desfășoară și o *activitate secretorie*, reprezentată prin biosinteza factorului Willebrand la nivelul reticulului endoplasmic rugos, unde începe și glicolizarea prin atașarea manozei, precum și dimerizarea prin formarea punților disulfidice. Glicoproteina se desăvîrșește în complexul Golgi și mai departe în corpii Weibel-Palade. Glicoproteina este sintetizată și în megacariocite. Absența sau defecte moleculare genetice ale glicoproteinei Willebrand determină tulburări în atașarea plachetelor sanguine la locurile de legare endotelială.

5.3. MATRICEA CONJUNCTIVĂ (SUBSTANTIA INTERCELLULARIS)

Substanța intercelulară a țesutului conjunctiv este alcătuită din două componente principale: fibrele conjunctive și substanța fundamentală.

Matricea intercelulară joacă un rol important în stabilirea și organizarea țesutului conjunctiv. Acesta este rezultatul unor multiple interacțiuni între celule și componentele extracelulare, cu aspecte caracteristice, după tipul de țesut în care se află. Astfel de caracteristici țin de tipul de colagen, de conținutul și prezența de fibronectină, laminină, entactină, proteoglicani. În plus, compoziția matricei este dependentă strîns și de forma celulei, precum și de gradul ei de diferențiere.

Fibrele conjunctive (Fibrae textus connectivi) sînt reprezentate prin fibrele de colagen, fibrele de reticulină și fibrele elastice.

5.3.1. FIBRELE DE COLAGEN (FIBRAE COLLAGENOSA)

Fibrele de colagen (Fibrae collagenosa) sînt alcătuite din proteine fibroase (scleroproteine), reprezentate prin moleculele de colagen. Acesta reprezintă aproximativ 25% din totalul proteinelor din organism. *Molecula de colagen* este lungă, de aproximativ 300 nm și are un diametru de 1,5 nm (fig. 5.13). Ea este formată din *trei lanțuri polipeptidice, numite lanțuri alfa*, răsucite helicoidal unul în jurul celuilalt ca firele într-o frînghie. Configurația de triplu helix este stabilizată în molecula de colagen prin punți de hidrogen și legături bisulfidice realizate între cele trei lanțuri. Două dintre lanțurile alfa dintr-o moleculă de colagen sînt asemănătoare și denumite lanțuri $alfa_1$. Acestea diferă prin frecvența aminoacizilor de al treilea lanț, denumit lanț

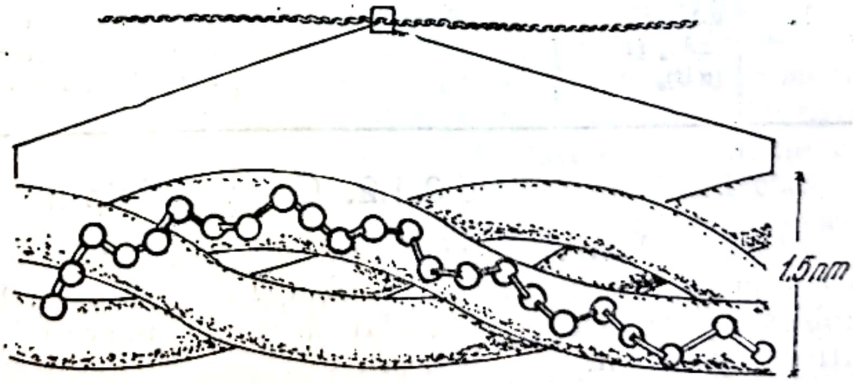


Fig. 5.13. — Molecula de colagen cu cele trei lanțuri polipepdice dispuse helicoidal.

Scanned with OKEN Scanner

alfa$_2$. Genetic, au fost identificate 7 lanțuri alfa, fiecare cu aproximativ 1 050 de reziduuri de aminoacizi. Deși se pot forma mai mult de 100 de tipuri diferite de colagen prin combinația celor 7 lanțuri alfa, numai cîteva dintre ele sînt mai bine cunoscute și conturate funcțional. Acestea au primit denumirea de colagen tip I, II, III, IV și V (tabelul 5.I).

5.3.1.1. Colagenul tip I

Colagenul tip I este format din două lanțuri alfa$_1$ tip I și un lanț alfa$_2$ tip I [alfa$_1$(I)]$_2$ și [alfa$_2$(I)]. El conține o cantitate mică de hidroxilizină și carbohidrați. Este format de către fibroblaste și osteoblaste, intră în alcătuirea fibrelor groase de colagen distribuite în piele, tendoane, oase, dentină, ligamente, capsule, cornee, organe interne.

TABELUL 5.1.

Tipuri de colagen la vertebrate

Tipul	Forma moleculară	Organizarea microscopică	Distribuția histologică	Caracteristici
I	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ (I)	Fibrile	Tendon, os, fascii, piele, vase, dentină etc.	Conținut scăzut în hidroxilizină; slab glicozilat; fibrile grupate în fibre
II	$[\alpha_1(II)]_3$	Fibrile	Cartilaj, corpul vitros, notocord	Conținut bogat în hidroxilizină; bogat glicozilat; fibrile subțiri
III	$[\alpha_1$ (III)$]_3$	Fibrile	Fibre de reticulină, organe limfoide, piele, vase	Multă hidroxiprolină și puțină hidroxilizină; telopeptida carboxilică lungă și cu punți disulfidice
IV	$[\alpha_1$ (IV)$]_3$	Membrane bazale	Membrane bazale ale epiteliilor	Foarte bogate în hidroxilizină; înalt glicozilate; relativ bogate în 3-hidroxiprolină; păstrează extremitățile propeptidice
V	$\alpha A(\alpha B)_2$ sau $(\alpha A)_3$ și $(\alpha B)_3$	Membrane bazale	Membranele bazale ale celulelor musculare, fibroblaștilor	Bogate în hidroxilizină, înalt glicozilată; nu formează fibrile

5.3.1.2. Colagenul tip II

Colagenul tip II, format din trei lanțuri alfa$_1$ tip II [alfa$_1$(II)]$_3$, conține în concentrație ridicată hidroxilizină și carbohidrați. Este sintetizat de condroblaste și se găsește în cartilaj, discurile intervertebrale, notocord, corpul vitros al ochiului.

5.3.1.3. Colagenul tip III

Colagenul tip III, alcătuit din trei lanțuri alfa$_1$ tip III [alfa$_1$(III)]$_3$, este bogat în hidroxiprolină și sărac în hidroxilizină și carbohidrați. Este sintetizat în fibroblaste, fibrele musculare netede și celulele endoteliale. În organism intră în alcătuirea fibrelor de colagen subțiri; se găsește în piele, vasele sanguine, organele interne.

Scanned with OKEN Scanner

Colagenul tip I, II și III polimerizează sub formă de fibrile de colagen și organizează colagenul fibrilar sau interstițial care intră în alcătuirea fibrelor de colagen și a celor de reticulină.

5.3.1.4. Colagenul tip IV

Colagenul tip IV este format din trei lanțuri alfa$_1$ tip IV [alfa$_1$(IV)]$_3$. Pînă în prezent structura lui nu este complet elucidată. Conține o mare proporție de hidroxilizină și carbohidrați. Este sintetizat de către celulele epiteliale și endoteliale.

5.3.1.5. Colagenul tip V

Colagenul tip V este format din două lanțuri alfa$_1$ tip V și un lanț alfa$_2$ tip V [alfa$_1$(V)]$_2$ și [alfa$_2$(V)]$_1$; mai este denumit și colagen A, B. Molecula sa este bogată în hidroxilizină și hidrocarbonați și este sintetizată de către fibroblaste. Se găsește răspîndit în toate țesuturile conjunctive în cantități mici; forma sa de polimerizare nu este cunoscută.

Întrucît colagenul tip IV și tip V nu formează fibrile, mai poartă denumirea de colagen afibrilar; acestea intră în alcătuirea membranelor bazale.

Lanțurile alfa ale moleculei de colagen sînt foarte bogate în glicină (33%), prolină (12%) și hidroxiprolină (10%). În cantități mici se întîlnesc tirozina și aminoacizii sulfatați. Glicina apare în lanțul polipeptidic întotdeauna în pozițiile multiplu de trei, ceea ce arată că molecula de colagen are o compoziție calitativă și cantitativă constantă a aminoacizilor. Formula lui moleculară este: (X-Y glicină)$_{333}$. Hidroxiprolina și hidroxilizina sînt caracteristice moleculei de colagen și nu se găsesc decît expcețional în alte tipuri de proteine. Grupele hidroxil ale hidroxiprolinei formează legături de hidrogen între lanțurile polipeptidice stabilizînd astfel triplul helix. Această stabilitate este alterată în avitaminoza C (scorbut), în anemii feriprive (lipsa fierului), în hipooxigenare. Hidroxilizina este necesară formării colagenului nu numai pentru glicozilarea procolagenului dar și pentru polimerizarea, prin punți transversale covalente, a moleculelor nou-formate atît în ectoplasma fibroblastului, cît, mai ales, după exocitarea lor în matricea extracelulară.

Moleculele de colagen (fig. 5.14) realizează în mediul extracelular *microfibrile (microfibrillae)* cu diametrul de 10—200 nm, observabile la nivel ultrastructural. Ele se caracterizează printr-o periodicitate de 64 nm, fiecare microfibrilă de colagen prezentînd o alternanță regulată de benzi clare și întunecate. Acestea apar datorită aranjării moleculelor de colagen (tropocolagen) în fibrile care sînt paralele între ele și în scară, determinînd astfel de-a lungul fibrilei zone lacunare de 35 nm, ce alternează regulat cu zone de surapunere. Zonele sau benzile lacunare apar negre la microscopul electronic, deoarece au mai mulți radicali liberi care leagă mai ușor colorantul negativ. S-a imaginat și un model posibil de aranjament al microfibrilelor în fibrile (fig. 5.15).

Moleculele adiacente sînt distanțate cu 64 nm iar între moleculele succesive dintr-un rînd se află un *gap* de 35 nm. Mărimea *gap*-ului este astfel aranjată încît se repetă după 5 molecule de colagen.

Microfibrilele se grupează formînd *fibrilele de colagen (fibrilla collagenosa)* groase de 0,2—0,5 micrometri. Legarea microfibrilelor se realizează

Scanned with OKEN Scanner

la început prin interacțiuni necovalente, apoi, odată fibrila formată, ea va fi stabilizată prin legături transversale covalente. Acestea se dezvoltă extracelular și fac ca fibrila să devină mai tensionată, mai puțin solubilă și mai puțin expusă enzimelor proteolitice.

Fibrilele de colagen se asociază în număr diferit și realizează *fibrele de colagen*, cu grosimi diferite, între 1 și 20 micrometri. Fibrele sînt unite între ele

Fig. 5.14. — Imagine electronooptică a fibrei de colagen *(A)* și elastice *(B)*.

prin carbohidrați cu hexoze în principal, care dau reacția PAS-pozitivă fibrelor de colagen. Ele sînt mai numeroase în fibrele de colagen subțiri (reticulină).

Fibrele de colagen sînt lungi, sinuoase, cilindrice, cu capete care se pierd în matricea extracelulară. Ele sînt acidofile, se colorează roz cu eozina, albastru în coloraţia tricrom Mallory și verde în coloraţia tricrom Masson. Fibrele de colagen nu se anastomozează, dar pot alcătui benzi în unele țesuturi conjunctive. Ele poartă și denumirea de fibre albe, sînt foarte rezistente și apar birefringente la microscopul de polarizare. Fibrele de colagen pot fi degradate sub acțiunea colagenazei care clivează molecula de tropocolagen, respectiv cele trei lanțuri alfa, la un anumit nivel al acestora și împart astfel triplul helix în două fragmente inegale, unul reprezentînd 75% din moleculă, iar celălalt — 25%. Mai rar, colagenazele pot separa unele de altele cele trei lanțuri ale moleculei de colagen. Degradarea fibrelor de colagen este urmată de resorbția moleculelor care rezultă, proces mai activ în perioada de creștere a organismului, după distrugeri ale țesutului conjunctiv sau după procese

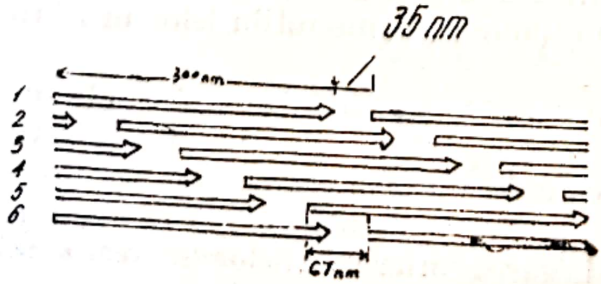


Fig. 5.15.—Molecula de colagen cu periodicitatea caracteristică.

Scanned with OKEN Scanner

inflamatorii. În același timp însă este stimulată și refacerea fibrelor de colagen de către fibroblaste, în așa fel încît în condiții fiziologice există o balanță pozitivă între resorbție și refacere. Colagenazele sînt enzime eliberate de către fibroblaste, leucocite polimorfonuclare, macrofage, unele celule epiteliale ale pielii, celulele epiteliale sinoviale. Unele colagenaze sînt eliberate ca precursori inactivi, care se pot reactiva în contact cu alte enzime (probabil cu proteaze), intervenind apoi singure sau împreună cu acestea spre a cliva molecula de colagen. Cu cît fibrele de colagen sînt mai tinere, cu atît sînt mai ușor atacate de enzime și mai solubile; devenite mature, ele sînt insolubile și cu greu pot fi digerate.

5.3.1.6. Formarea moleculelor de colagen (fibrilogeneza)

În general, în țesuturile conjunctive colagenul este sintetizat și secretat de către fibroblaste, în cartilaj de către condroblaste, iar în țesutul osos de către osteoblaste. Formarea lui are loc în două etape: *a) etapa intracelulară* presupune transcripția, traducerea, hidroxilarea reziduurilor specifice de prolină și lizină, precum și glicozilarea reziduurilor de hidrolizină, eliberarea lanțurilor polipeptidice, formarea legăturilor bisulfidice, asamblarea lanțurilor polipeptidice cu formarea de triplu helix și secreție (exocitarea în mediul extracelular); *b) etapa extracelulară* în cursul căreia în matricea extracelulară procolagenul este convertit în colagen (tropocolagen); urmează polimerizarea moleculelor și realizarea fibrelor de colagen (fig. 5.16).

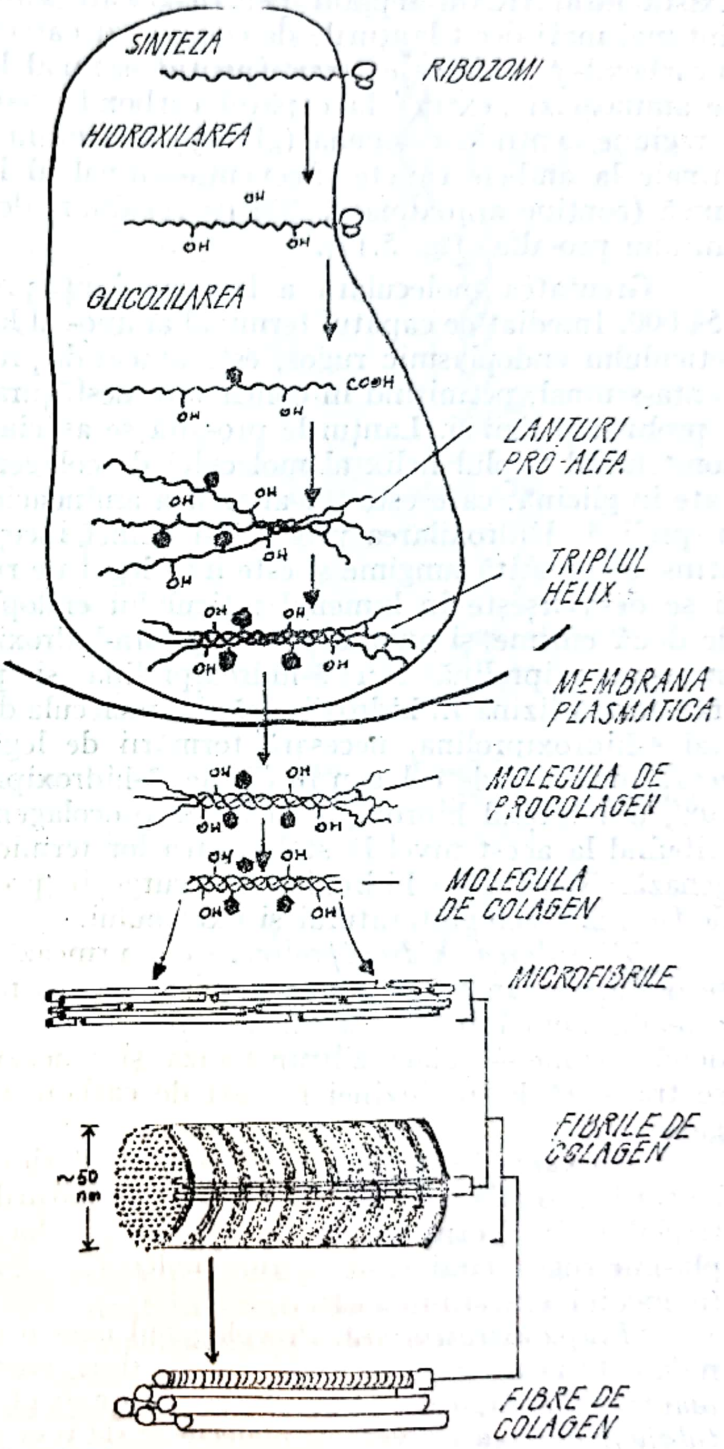


Fig. 5.16. — Momentele principale ale fibrilogenezei (intra- și extracelular).

Scanned with OKEN Scanner

În fibroblaste, colagenul este sintetizat la nivelul ribozomilor reticulului endoplasmic rugos, cu unități precursoare mari, numite *lanțuri pro-alfa*.

Transcripția și traducerea colagenului sînt puțin cunoscute; în general procesul este asemănător cu ceea ce se petrece în cazul celorlalte proteine. Studii recente, cu rezultate contradictorii însă, arată că genele pentru colagenul tip I ar fi localizate pe cromozomul 17, iar după alții, pe cromozomul 7. Există însă ARNm separat pentru fiecare lanț pro-alfa. Acești precursori sînt mai mari decît lanțurile de colagen, deoarece prezintă la capetele amino- și carboxil- *peptide de extensie* (peptide-semnal la capătul amino- și secvențe de aminoacizi „extra" la capătul carboxil-) Astfel, lanțurile pro-alfa conțin o regiune centrală colagenă (gli-x-y) și regiuni propeptidice necolagene terminale la ambele capete. Secvența-semnal al lanțului pro-alfa$_1$ este foarte lungă (conține aproximativ 100 de reziduuri de aminoacizi) și diferită de a lanțului pro-alfa (fig. 5.17).

Greutatea moleculară a fiecărui lanț pro-alfa este de aproximativ 154 000. Imediat ce capătul terminal amino- al lanțului alfa ajunge în lumenul reticulului endoplasmic rugos, este atacat de proteaze care îndepărtează secvența-semnal, permițînd în continuare desfășurarea procesului de hidroxilare a prolinei și lizinei. Lanțurile pro-alfa se asociază prin legături de hidrogen, constituind triplul helix al moleculei de colagen. Lanțurile pro-alfa sînt bogate în glicină, care este tot al treilea aminoacid, și de asemenea sînt bogate în prolină. Hidroxilarea prolinei și lizinei începe după ce lanțul peptidic a atins o anumită lungime și este încă legat de ribozomi. Procesul se continuă și se desăvîrșește în lumenul reticulului endoplasmic rugos, fiind catalizat de două enzime, și anume peptidilprolin-hidroxilaza care transformă prolina în 4-hidroxiprolină sau 3-hidroxiprolină și peptidillizin-hidroxilaza care transformă lizina în hidroxilizină. În molecula de colagen se întîlnește în special 4-hidroxiprolina, necesară formării de legături transversale ce stabilizează molecula de colagen în fibrile. 3-hidroxiprolina reprezintă aproximativ 10% din totalul hidroxiprolinei din procolagenul membranelor bazale, contribuind la acest nivel la stabilitatea lor termică și la rezistența lor la colagenază. Reacția de hidroxilare decurge în prezența vitaminei C, a ionilor de fier, alfa-cetoglutaratului și oxigenului.

Glicozilarea hidroxiprolinei, ce urmează procesului de hidroxilare, se desfășoară în cisternele reticulului endoplasmic rugos, la nivelul lanțurilor pro-alfa numai în forma lor nehelicoidală. Glicozilarea este catalizată de două enzime — galactoziltransferaza și glucoziltransferaza. Prin glicozilare se transferă hidroxilizinei hidrați de carbon, mai ales galactoză și glicozil-galactoză.

Formarea legăturilor disulfidice în interiorul lanțului pro-alfa, sau între lanțurile pro-alfa, este esențială pentru îndoiturile ce se realizează și determină triplul helix. Formarea triplului helix are loc în lumenul reticulului endoplasmic rugos, cînd se constituie molecula de *procolagen*, care va fi exocitată în mediul extrafibroblastic.

Etapa extracelulară. Procolagenul nou-format este secretat extracelular, moment în care intră în acțiune noi enzime, *procolagen-peptidazele (procolagen-aminopeptidaza*, care îndepărtează aminopeptidele și *procolagen-carboxipeptidaza)*. Acestea convertesc moleculele de procolagen în molecule de *colagen* (tropocolagen), rupînd cea mai mare parte a peptidelor nehelicoidale de la capetele precursorului (ale procolagenului).

Scanned with OKEN Scanner

Moleculele de colagen rezultate din clivajul procolagenului, se asamblează în fibrile care nu se deosebesc la microscop de fibrilele mature din țesuturi; primele nu au însă stabilitate pînă cînd nu sînt legate prin punți covalente (fig. 5.18). Legarea colagenului în fibrile se efectuează în două sau trei etape: în prima are loc dezaminarea oxidativă a grupurilor amino- în unele reziduuri lizil și hidroxilizil, prin acțiunea liziloxidazei, rezultînd aldehide reactive. În a doua etapă, aceste grupări pot forma legături transversale, intramoleculare, care leagă lanțurile alfa ale aceleiași molecule, prin condensarea aldolică a celor două aldehide, și legături transversale prin condensarea unei aldehide derivate din lizină, hidroxilizină, sau hidroxilizină glicozilată de o grupare amino- a celei de a doua lizine, hidroxilizine sau hidroxilizine glicozilate.

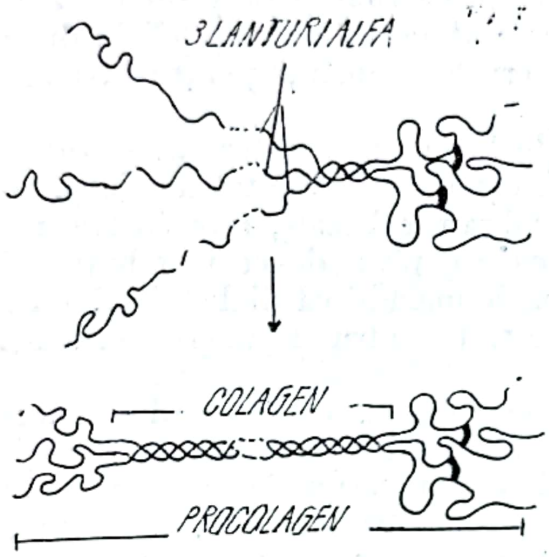


Fig. 5. 17. — Molecula de procolagen și de colagen.

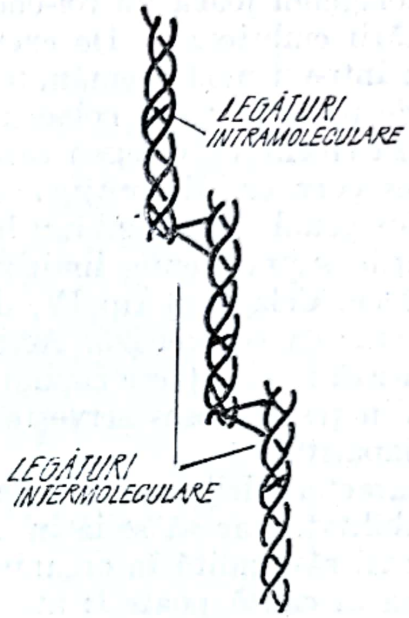


Fig. 5. 18. — Legăturile intra- și intermoleculare în fibrele de colagen.

În colagenul tip I, II și III fibrilele se agregă spontan; la acest proces contribuie și proteoglicanii. Se formează astfel subunități microfibrilare care, prin asociere cu altele, realizează fibrilele. Între ele se stabilesc punți de hidrogen și interacțiuni hidrofobe care mențin stabilitatea fibrilelor. Într-o etapă ulterioară stabilitatea crește și prin formarea de punți covalente, proces catalizat de liziloxidază.

5.3.1.7. Funcțiile colagenului

Colagenul este proteina majoră a țesuturilor conjunctive. Rolul lui principal este de a realiza rezistența țesuturilor conjunctive la tensiune și tracțiune. Acest rol este mai evident în țesuturile conjunctive dense (ligamente și tendoane) dar la fel de important în toate tipurile de țesuturi conjunctive. Rezistența moleculei de colagen se realizează prin legăturile transversale intermoleculare, prin forțele dintre fibrile și fibrele de colagen, prin interacțiunile fizice și/sau chimice dintre colagen și celelalte componente ale matricei extracelulare.

Scanned with OKEN Scanner

O altă funcție a colagenului este aceea de a permite țesuturilor conjunctive să se plieze, să fie extensibile, datorită sinuozităților fibrilelor și fibrelor de colagen sau alunecării acestora unele față de celelalte.

Fibrele de colagen au funcția de a limita mișcarea țesuturilor și a organelor cu care se învecinează: de exemplu, în cartilaj fibrele de colagen formează o plasă care limitează mișcarea proteoglicanilor și a lichidului tisular din ochiurile rețelei.

Colagenul induce agregarea trombocitelor și formarea coagulului sanguin.

Colagenul joacă un rol-cheie în reglarea diferențierii celulare în timpul dezvoltării embrionare. De exemplu, dezvoltarea vertebrală este inițiată de colagen într-un mod asemănător celui din cartilaj și de proteoglicani sintetizați de notocord; sau colagenul sintetizat de celulele epiteliale din cornee formează fibrile de colagen care vor servi ca substrat pentru invazia fibroblastelor corneene definitive.

Colagenul din membranele bazale formează o rețea de suport pentru structurile supraiacente, limitînd la acest nivel mobilitatea glicoproteinelor necolagene. Colagenul tip IV, din membranele bazale, este foarte rezistent la digestia cu colagenază. Aceasta poate explica de ce membranele bazale acumulează în apropiere capilare, în unele maladii ca diabetul zaharat. Colagenul din țesutul osos servește ca substrat pentru depunerea cristalelor de hidroxiapatită.

Caracteristicile moleculei tinere de colagen, cu un grad mai accentuat de solubilitate, fac să se ia în discuție posibilitatea acestei proteine fibroase — cel mai răspîndită în organism — de a stimula un răspuns imun. În plus, proteina în cauză poate fi atacată de enzime (colagenază), iar structura de triplu helix permite dezorganizarea ei sub acțiunea căldurii sau a soluțiilor slabe, cu formarea de lanțuri polipeptidice separate — însușiri care atrag atenția asupra macromoleculei de colagen și a proprietăților ei antigenice. De asemenea conținutul său bogat în glicină, care este reziduul cel mai activ imunologic, ca și slaba reprezentare a grupărilor sulfonice și a aminoacizilor aromatici de tipul triptofanului și tirozinei, ar putea explica proprietățile imunologice ale colagenului și ale produselor sale de degradare. De altfel nu poate fi exclusă intervenția colagenului în manifestările patologice ale răspunsului imun, în special fenomenele de autoimunitate — cel puțin în cele două boli caracteristice țesutului conjunctiv, și anume lupusul eritematos diseminat și artrita reumatoidă.

5.3.2. FIBRELE ELASTICE (FIBRAE ELASTICAE)

Fibrele elastice sau fibrele galbene, cu diametrul lor de aproximativ 1 micrometru, sînt mai subțiri decît cele colagene. Ele se ramifică și se anastomozează realizînd rețele neregulate. Se colorează electiv cu orceină în roșu-brun întunecat, cu rezorcin-fuxină (Weigert) în roșu-aprins, cu aldehid-fuxină (Gömöri) în negru; cu hematoxilină-eozină se colorează slab și inconstant. Fibrele elastice sînt rezistente, au proprietatea de a fi extensibile (100—120%), deci de a reveni la lungimea inițială după ce tracțiunea asupra lor a încetat. Fibrele elastice se găsesc în special în țesutul conjunctiv lax, în pereții vaselor sanguine, în plămîn, în piele. La vîrstă înaintată ele se răresc, ceea ce determină apariția disfuncțiilor organelor respective (fig. 5.19).

Scanned with OKEN Scanner

Fibrele elastice sînt monofibrilare, cu o compoziție aproximativ similară de aminoacizi ca și fibrele de colagen. Ele sînt bogate în prolină și glicină dar conțin puțină hidroxiprolină, deloc hidroxilizină și o cantitate mai mare de valină și alanină, spre deosebire de fibrele de colagen. Mai conțin desmozină și izodesmozină. Observate la microscopul electronic, fibrele elastice prezintă în centru o *masă amorfă*, astructurată, ce conține elastina, înconjurată de o

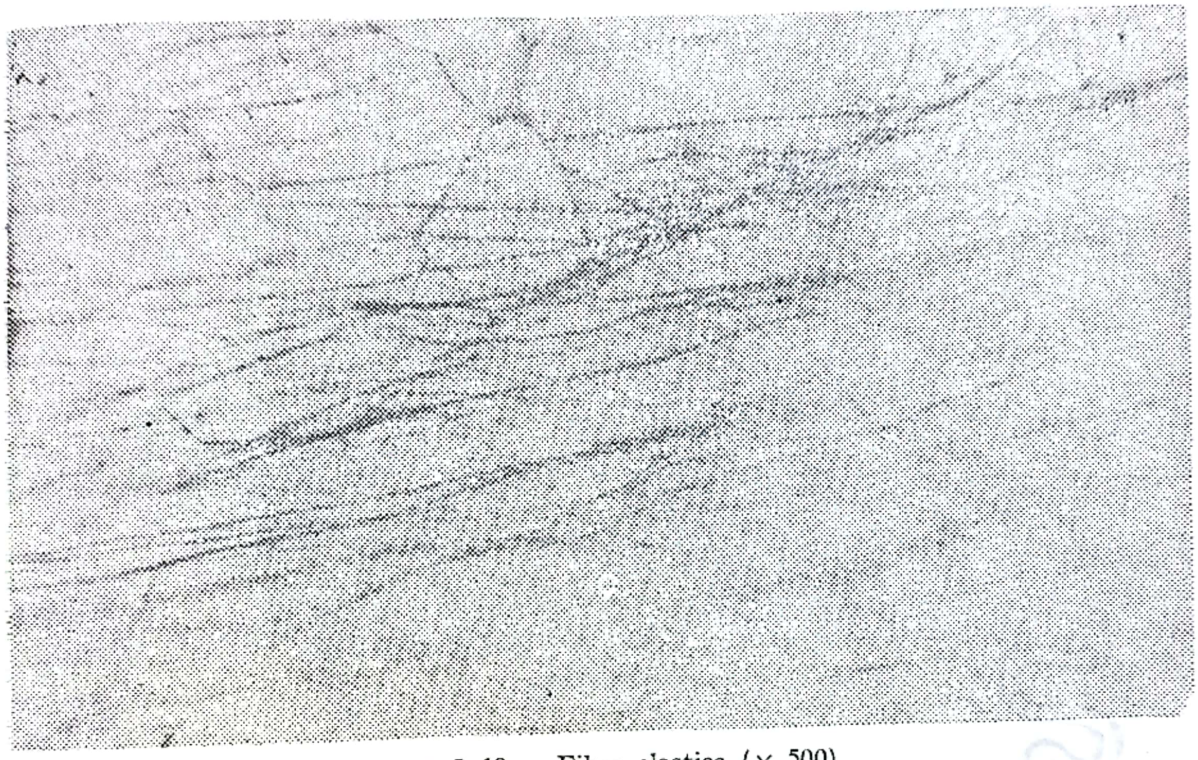


Fig. 5. 19. — Fibre elastice (× 500).

teacă de *microtubuli*, dispuși în benzi și avînd direcția paralelă cu axul lung al fibrei. Acești microtubuli sînt formați din glicoproteine; ei apar primii în cursul formării fibrei de către fibroblast și scopul lor este acela de a orienta depunerea elastinei în regiunea centrală amorfă.

5.3.2.1. Elastina

Elastina este sintetizată de către fibroblastele din piele și tendoane sau de către fibrele musculare netede în pereții vaselor mari. Elastina este sintetizată și secretată ca precursor, numit *tropoelastină*, în matricea extracelulară, unde are loc polimerizarea fibrelor elastice. Elastina este rezistentă la fierbere, la extracția cu acizi și baze diluate, la acțiunea tripsinei. Este hidrolizată de o enzimă — *elastaza* — , secretată în principal de pancreas (fig. 5.20). Moleculele de elastină, sinuoase și de forme diferite, sînt legate între ele prin punți

Scanned with OKEN Scanner

necovalente slabe, ca și prin punți covalente distanțate, care permit rețelei elastice să se întindă și să se strîngă întocmai ca o gumă (fig. 5.21). Elastina poate servi drept matrice pentru calcifiere, explicînd astfel formarea plăcilor ateromatoase și calcifierea unor țesuturi.

Fig. 5. 20. — Diferite forme ale moleculei de elastină.

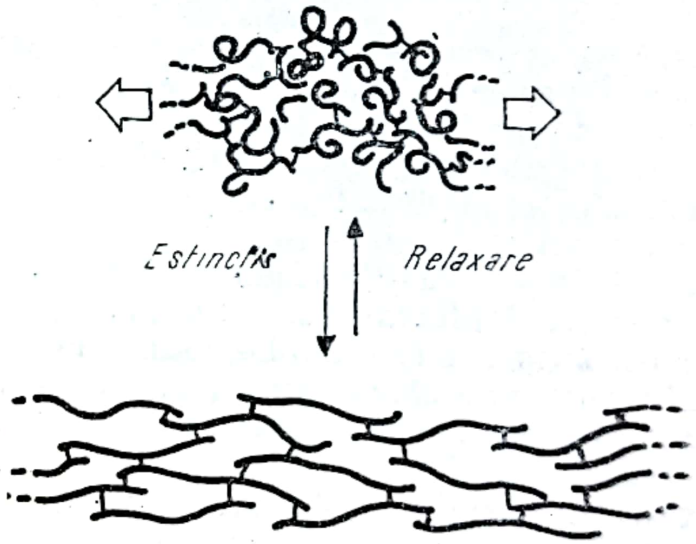


Fig. 5. 21. — Contracția și relaxarea moleculelor de elastină în fibra elastică.

5.3.2.2. Fibrele oxitalanice

Fibrele oxitalanice sînt considerate o varietate de fibre elastice, foarte rezistente la acizi. Ele se găsesc în număr mare în ligamentele dentare, unde se dispun printre fibrele de colagen și de reticulină. Fibrele oxitalanice sînt mai groase și mai rigide decît fibrele elastice. Ele se pot colora cu coloranții fibrei elastice (orceina, fucsina), numai după prealabila lor tratare cu acid peracetic, acid permanganic sau acid performic. Fibrele oxitalanice rezistă la digestia cu elastază, dar după tratarea lor cu acid peracetic sînt imediat degradate. Fibrele oxitalanice apar în țesuturile de regenerare; numărul lor crește în bolile parodonțiului sau în chisturile radiculare dentare.

Scanned with OKEN Scanner

5.3.3. FIBRELE DE RETICULINĂ (FIBRAE RETICULARIS)

Sînt foarte subțiri, cu diametrul între 0,5 și 2 μm. Nu sînt grupate în fascicule, prezintă ramificații și formează frecvent rețele. Pot fi mai bine observate în contrast de fază și la microscopul de polarizație, după colorare cu roșu Sirius; se colorează pe preparatele fixate aproximativ la fel cu cele de colagen (cu albastru de anilină) (fig. 5.22). În plus, ele prezintă o argirofilie

Fig. 5.22. — Fibre de reticulină (× 320).

pronunțată *(fibre argirofile)*, ceea ce permite buna evidențiere cu săruri de argint. Dau reacția PAS-pozitivă datorită conținutului mai mare în glicoproteine caracteristice acestor fibre. Conțin hexoze în procent de 6—12 față de 1% — în fibrele de colagen. Fibrele de reticulină se găsesc în special în țesuturile hemopoietice și limfopoietice (măduva osoasă hematogenă, organele limfoide), în jurul capilarelor, în membranele bazale, în organele endocrine, în ficat, rinichi sau — în condiții patologice — în cursul reparării țesuturilor după lezare sau pierdere.

Fibrele de reticulină conțin molecule de colagen tip III, comparativ cu fibrele de colagen, alcătuite din colagen tip I. La microscopul electronic, fibra de reticulină apare formată din fibrile groase de 45 nm, strîns împachetate și legate între ele prin punți de proteoglicani și glicoproteine. S-a considerat că acestea ar reprezenta fibrele imature de colagen. În ultima vreme fibrele de reticulină sînt privite ca entități separate, cu caracteristici precise de structură și funcție. Ele se formează, ca și celelalte două tipuri de fibre conjunctive, în fibroblaste (sinteza de molecule de colagen tip III, ce vor fi exocitate și polimerizate extracelular).

Scanned with OKEN Scanner

5.3.4. MODIFICĂRI ALE MOLECULEI DE COLAGEN ȘI ELASTINĂ ÎN CONDIȚII FIZIOLOGICE ȘI PATOLOGICE

În cursul *procesului de îmbătrînire*, colagenul și elastina suferă modificări structurale fizice și chimice progresive, cum ar fi creșterea numărului de legături transversale, cu consecințe asupra funcționalității țesuturilor respective. În raport cu vîrsta, se observă de asemenea în unele țesuturi conjunctive, modificări ale raportului dintre diferitele tipuri de colagen. Astfel, țesutul conjunctiv din dermul pielii fătului uman conține mai mult de 60% colagen tip III, în timp ce la adult procentul scade la mai puțin de 20, ca o consecință a înlocuirii cu colagen tip I.

În *boli ereditare*, pot apărea, în orice moment al formării fibrelor conjunctive, molecule de colagen și elastină denaturate, care devin de obicei fragile și/sau hiperextensibile, datorită alterării structurii primare, reducerii legăturilor transversale mature, insuficientului conținut de hidroxilizină sau hidroxilizină glicozilată ce determină instabilitatea legăturilor interfibrilare. Pe aceste macromolecule denaturate se poate depune un material cu mare afinitate pentru calciu și magneziu. În multe din bolile ereditare (genetice) este afectată sinteza de colagen prin substituție sau deleție de aminoacizi, asemănător hemoglobinopatiilor și talasemiei. Biosinteza de colagen poate fi alterată nu numai prin defecte de transcripție și traducere, ci și în cursul proceselor posttraducere, mai ales prin deficiența enzimelor implicate ca lizilhidroxilaza, liziloxidaza și procolagen-peptidaza. Aceste defecte genetice determină boli sau sindroame ca: osteogeneza imperfectă, sindromul Ehlers-Danlos (scăderea colagenului tip III și tip IV, în special prin defect al hidroxilizinei și procolagen-peptidazei), *cutix laxa* (prin scăderea activității liziloxidazei), sindromul Menkes, sindromul Marfan, homocistinuria — fiecare cu manifestări clinice diferite. Scăderea activității liziloxidazei — de exemplu în *cutix laxa* — , enzimă asociată cu formarea fibrelor conjunctive, duce la apariția secvențelor anormale de aminoacizi glicină-glicină-valină-prolină și a secvenței valină-prolină-glicină-valină-glicină. Apariția colagenului, și mai ales a elastinei anormale în pereții vaselor sanguine, accentuează procesul de aterogeneză început în endoteliu și în fibrele musculare netede ale mediei arteriolare. În aceste condiții, în molecula de elastină alterată cresc aminoacizii polari ca aspartatul, glutamatul, lizina și arginina, care permit calciului și lipidelor să se depoziteze în pereții vasculari. În mod normal molecula de elastină conține în majoritate aminoacizi nepolari ca glicina, prolina, alanina, valina, fenilalanina, leucina și izoleucina, în timp ce aminoacizii polari se găsesc în proporție de numai 5%.

În *bolile cîștigate* se produc de obicei modificări ale activității de sinteză a fibroblastelor, manifestate prin creșterea sau descreșterea relației colagen tip I/tip III, creșterea relației colagen tip I/tip II sau a cantității de colagen tip I trimer (moleculă de colagen formată din trei lanțuri alfa$_1$ identice). Se formează de asemenea molecule anormale de colagen în osteoartrite, în diabet, unde se produc și alterări ale agregării plachetare și ale formării coagulului sanguin.

Scanned with OKEN Scanner

5.3.5. SUBSTANȚA FUNDAMENTALĂ

Numită și substanța interfibrilară sau intracelulară, substanța fundamentală a țesuturilor conjunctive apare amorfă, incoloră, transparentă, omogenă și vîscoasă. Este alcătuită din diferite molecule, ce cuprind proteinele fibroase de tipul colagenului și elastinei, *glicozaminoglicanii* și *glicoproteinele structurale*.

5.3.5.1. Glicozaminoglicanii

Glicozaminoglicanii, cunoscuți în trecut sub denumirea de mucopolizaharide, sînt complexe polizaharidice compuse din unități repetitive de dizaharide, în care unul din cele două reziduuri de glucid care se repetă este un aminoglucid, respectiv N-acetil-glucozamina sau N-acetil-galactozamina. Deci hexozamina poate fi glucozamina sau galactozamina, iar acidul uronic poate fi glucuronic sau iduronic (tabelul 5.II).

Din grupul glicozaminoglicanilor, care reprezintă 10% în raport cu proteinele fibroase de colagen și elastină, fac parte: *acidul hialuronic* (singurul nesulfatat), *condroitin-sulfații*, *heparan-sulfații* și *keratan-sulfații*, *heparina*. Cu excepția acidului hialuronic, toți ceilalți glicozaminoglicani sînt legați covalent de o proteină cu care formează *molecule de proteoglicani* (numite altădată mucoproteine); aceasta reprezintă în partea glucidică 80—90% din greutatea moleculară, glucidele fiind formate din lanțuri neramificate de glicozaminoglicani, de obicei fără acid sialic. Proteoglicanii sînt foarte heterogeni în ceea ce privește conținutul proteic, mărimea moleculei și numărul

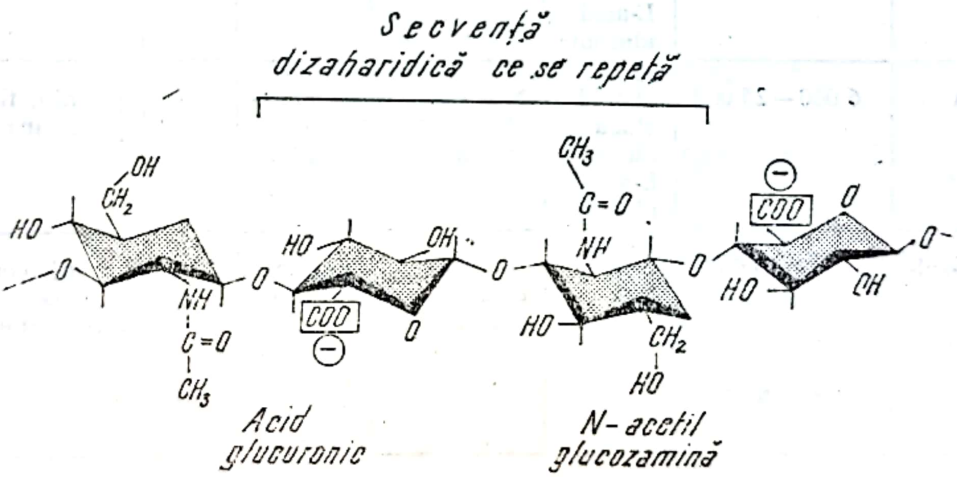


Fig. 5. 23. — Schemă reprezentînd frecvența dizaharidică repetitivă în proteoglicani.

de tipuri de glicozaminoglicani din moleculă, dar cu o repetare regulată de dizaharide similare (fig. 5.23). Proteoglicanii sînt bogați în grupări hidroxil, carboxil și sulfat, astfel că apar intens hidrofili și, în consecință, acționează ca polianioni. Ei se pot lega astfel de un număr mare de cationi (în special de sodiu) și sînt puternic hidratați (gel hidratat). Datorită organizării în gel hidratat, lanțul de glicozaminoglicani difuzează repede între celule, facili-

Scanned with OKEN Scanner

Glicozaminoglicanii

Glicozaminoglicani	Greutate moleculară	Monozaharide A	Monozaharide B	Alte componente glucidice	Legați de proteine	Distribuția în țesuturi
Acidul hialuronic	4 000 la 8×10^6	D-acid glucuronic	N-acetil-glucozamina	—	—	toate tipurile de țesut conjunctiv, piele, corp vitros, cartilaj, lichid sinovial
Condroitin-4-sulfat	5 000—50 000	D-acid glucuronic	N-acetil-galactozamina	D-galactoză D-xiloză	+	cartilaj, cornee, os, piele, artere
Condroitin-6-sulfat	5 000—50 000	D-acid glucuronic	N-acetil-galactozamina	D-galactoză D-xiloză	+	cornee, os, piele, artere
Dermatan-sulfat	15 000—40 000	D-acid glucuronic sau L-acid iduronic	N-acetil-galactozamina	D-galactoză D-xiloză	+	piele, sînge, vase, cord
Heparan-sulfat	5 000—12 000	D-acid glucuronic sau L-acid iduronic	N-acetil-glucozamina	D-galactoză D-xiloză	+	plămîn, artere, suprafețe celulare
Heparina	6 000—25 000	D-acid glucuronic sau L-acid iduronic	N-acetil-glucozamina	D-galactoză D-xiloză	+	plămîn, ficat, piele, mastocite
Keratan-sulfat	4 000—19 000	D-galactoza	N-acetil-glucozamina	D-galactozamina D-manoza L-fucoza, acid sialic	+	cartilaj, cornee, discuri intervertebrale

tează migrarea celulelor și formarea la nivelul acestora a numeroase prelungiri celulare. Majoritatea proteoglicanilor conțin miezul proteic asociat cu dermatan-sulfatul, condroitin-sulfatul sau heparan-sulfatul (fig. 5.24).

Organizarea glicozaminoglicanilor și a proteoglicanilor în matricea extraceluară este mai puțin bine cunoscută. Uneori pot fi legați unii de ceilalți sau de alte macromolecule locale cum ar fi colagenul, elastina, fibronectina (fig. 5.25). Pot crea agregate necovalente cu acidul hialuronic și pot lega unele metale grele. Alteori, se pot asambla în structuri helicoidale sau în structuri sub formă de panglici. La plante se pot asocia realizînd formațiuni radiare

Scanned with OKEN Scanner

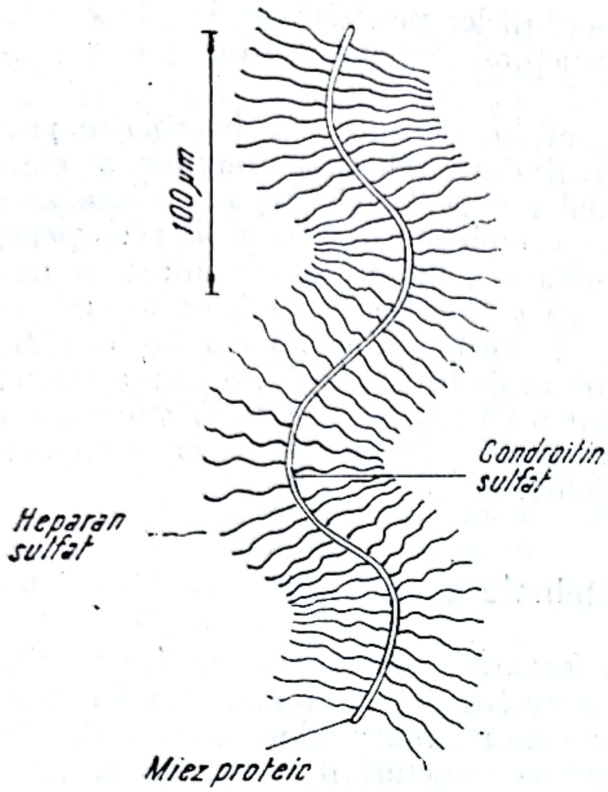
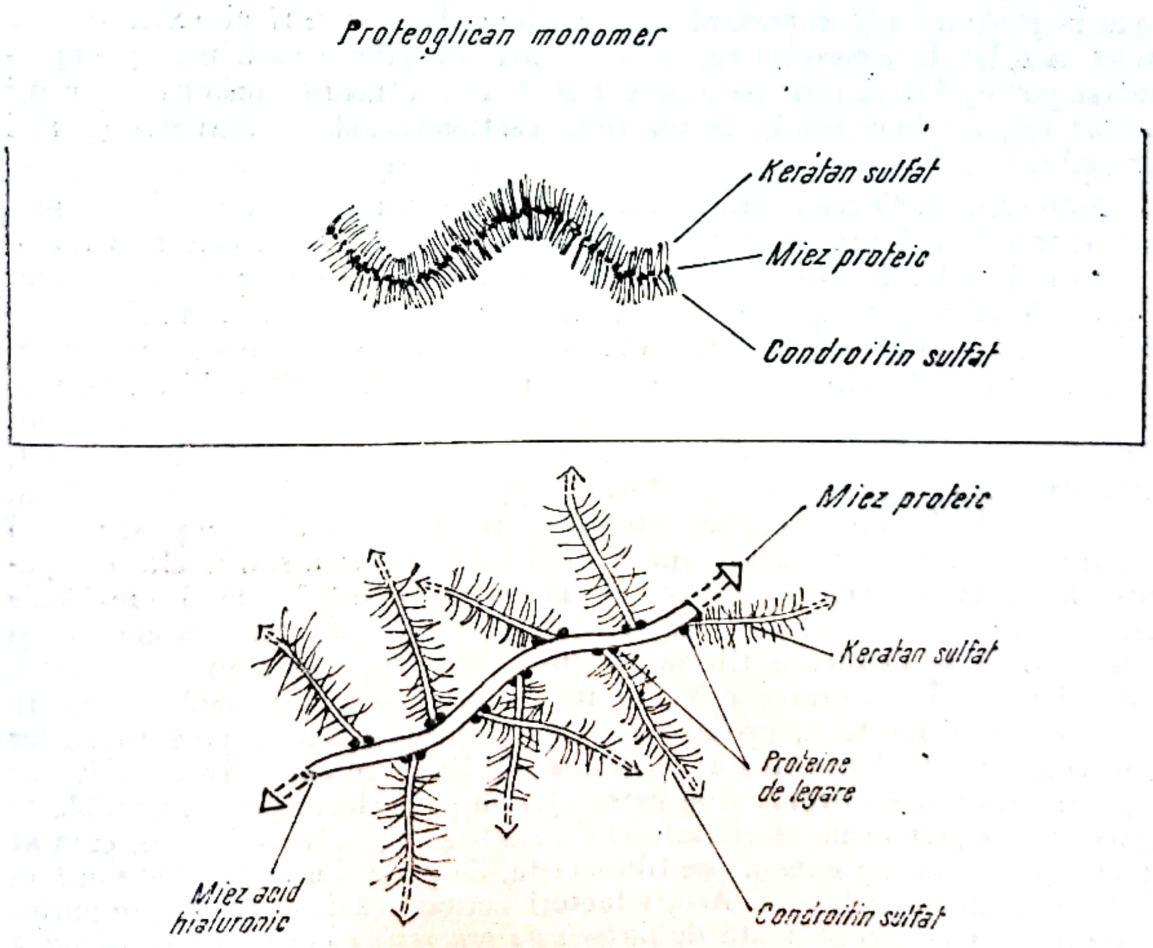


Fig. 5. 24. — Proteoglicani monomeri.

Fig. 5. 25. — Agregat de proteoglicani



Scanned with OKEN Scanner

cristaline ce intră în componența microfibrilelor peretelui celular. Proteoglicanii pot prezenta astfel conformații structurale tot atît de diferite ca și conformația lor diversă intramoleculară.

Glicozaminoglicanii și proteoglicanii se formează în fibroblaste prin mecanismul de sinteză comun glicoproteinelor. Sinteza proteinelor se efectuează la nivelul ribozomilor reticulului endoplasmic rugos. Glicozilarea începe în același organit (RER) și este completată în strncturile geologiene, unde se desfășoară și procesul lor de sulfatare. Ei sînt apoi eliminați în matricea extracelulară. Degradarea lor după o funcționare de 2—4 zile pentru acidul hialuronic sau de 7—10 zile pentru proteoglicani, se realizează de către macrofage prin sistemul lor de hidrolaze acide lizozomale. Deficiența acestor enzime antrenează perturbări în degradarea lor, determinînd la om apariția unor sindroame (de obicei genetice) ca sindromul Hurler, sindromul Hunter, sindromul San Fillipo, sindromul Marquio și altele.

5.3.5.2. Glicoproteinele structurale

Glicoproteinele structurale sînt formate predominant dintr-un miez proteic și din glucide care reprezintă între 1 și 60% din greutatea lor moleculară sub formă de polizaharide lineare ce nu conțin glucozamine. Mai degrabă polizaharidele glicoproteinelor conțin o structură de oligozaharide ramificate, scurte, care se termină adesea cu acid sialic. Cunoscute mai de curînd, ele par să joace un rol important în funcționalitatea matricei extracelulare cum ar fi relațiile intercelulare, adezivitatea celulelor etc. Dintre glicoproteine fac parte *fibronectinele* (se găsesc în matricea tuturor tipurilor de țesuturi conjunctive), *condronectinele* (în matricea cartilaginoasă), *lamininele* (numai în membranele bazale).

Fibronectina. Concentrația cea mai mare de fibronectină se află în matricea extracelulară din țesuturile conjunctive, precum și în cele mai multe membrane bazale. Fibroblastele și celulele endoteliale sînt principalii producători de fibronectină în matricea extracelulară, mai puțin unele celule epiteliale. Fibronectina este o glicoproteină compusă din două subunități legate prin punți bisulfidice, cu greutatea medie de 220 000 daltoni. În matricea extracelulară se găsește sub formă de agregate. Fibronectinele pot interacționa cu alte molecule ca gelatina, colagenul I—V, colagenul denaturat, fibrina, fibrinogenul, heparina, proteoglicanii, diferite celule, hematii, actina, ADN, acidul hialuronic, gangliozidele, unele componente ale complementului etc. Fibronectinele mediază adeziunea celulelor la colagen sau la alte componente ale matricei extracelulare, acțiune la care pot contribui și alte molecule locale ca laminina, condronectina, factorul Willebrand, trombospondina și multe altele. De asemenea fibronectinele au rol important în organizarea citoscheletului. În migrarea celulelor în cursul diferențierii embrionare, în fagocitoză, în hemostază, precum și în transformarea oncogenică (lipsa lor poate constitui unul din factorii favorizanți ai malignizării). În anumite situații fibronectinele din matricea extracelulară pot înlocui pentru fibroblaste *factorii de competență* necesari sintezei de ADN și replicării celulelor, cum ar fi factorul de creștere eliberat de fibroblaste, de plachetele sanguine sau factorul de creștere epidermic. Acești factori acționează în faza G_1 timpurie; activitatea lor este continuată de *factorii de progresie* ca insulina, insulin-*like*

Scanned with OKEN Scanner

sau de factori de creștere derivați din macrofage etc., care intervin în faza G_1 tîrzie, semnalînd celulei să-și continue ciclul celular și să se dividă.

Fibronectinele se găsesc și în umorile organismului, cu concentrația cea mai mare în plasma sanguină, în proporție de aproximativ 300 micrograme/ml, fiind formate în principal de hepatocite dar și de celulele endoteliale sau de macrofage. În celelalte umori ale organismului ele se găsesc în concentrații foarte mici.

În matricea extracelulară din aproape toate țesuturile conjunctive s-a identificat o glicoproteină numită *glicoproteina 115* (necolagenă), cu greutatea moleculară de aproximativ 115 000. Ea este prezentă în cantitate mai mare în vasele sanguine, în fibrele musculare netede, în unele membrane bazale, avînd o funcție asemănătoare fibronectinei și lamininei.

În matricea conjunctivă se găsește în cantitate mică și *lichidul tisular*, care este asemănător plasmei sanguine. Apa, împreună cu molecule mici, inclusiv proteine cu greutate moleculară mică și împreună cu diferiți ioni, trece în țesutul conjunctiv la capătul terminal al capilarului, unde presiunea hidrostatică a sîngelui este mai mare decît presiunea osmotic-coloidală a plasmei sanguine.

Presiunea hidrostatică, consecință a acțiunii de pompare a sîngelui de către cord, scade treptat în capilar către capătul lui venos. Paralel crește presiunea osmotic-coloidală a plasmei sanguine (determinată de serumproteine) care permite apei din țesuturi să se reîntoarcă în capilare. Cantitatea de apă ce se reîntoarce este mai mică decît cea care trece în țesuturi. Prin circulația limfatică apa din țesut ajunge din nou în sîngele circulant. În unele condiții patologice (obstrucție venoasă, hipoproteinemie, lezări ale endoteliului capilar), apa se acumulează în cantitate mare în țesuturile conjunctive, realizînd *edemul*. Pe lîngă molecule organice, în lichidul tisular se găsesc și ioni, reprezentați în special prin sodiu și clor, mai puțin prin magneziu, calciu și potasiu.

5.4. TIPURI DE ȚESUTURI CONJUNCTIVE

Țesuturile conjunctive apar în organism sub mai multe forme, în raport cu predominanța unui component sau a altuia (celule, fibre, matrice extracelulară), sau cu funcțiile pe care le desfășoară.

- Țesuturi conjunctive
  - Țesut conjunctiv propriu-zis
    - lax (areolar)
    - dens
      - orientat (ordonat)
      - neorientat (neordonat)
  - Țesut conjunctiv cu proprietăți speciale
    - elastic
    - reticular
    - mucos
    - adipos
      - alb-galben
      - brun

Scanned with OKEN Scanner

5.4.1. ŢESUTURI CONJUNCTIVE PROPRIU-ZISE

5.4.1.1. Ţesutul conjunctiv lax sau areolar (Textus connectivus laxus)

Se găseşte foarte răspîndit în organism, constituind ţesutul conjunctiv prezent în toate locurile libere dintre organe, precum şi în constituţia acestora. Nu are formă proprie dar uneori poate constitui straturi sau lamele dispuse între ţesuturi şi organe. Este mai bine reprezentat în stratul papilar al dermului, în hipoderm, în corionul mucoaselor, în organele mobile sau mobilizabile, în seroase (peritoneu, pleură). Ţesutul conjunctiv lax este format din toate tipurile de celule conjunctive, dispuse fără o orientare aparentă. Dintre acestea predomină fibroblastele şi macrofagele. Sînt prezente fibrele de colagen, fibrele elastice şi de reticulină, ultimele însă în proporţie mai redusă. Matricea celulară este cea mai bine reprezentată. Ţesutul conjunctiv lax conţine un număr mare de vase saguine şi nervi. Printre rolurile multiple pe care le îndeplineşte, *rolul mecanic* permite, datorită flexibilităţii, deplasările şi alunecările ţesuturilor şi organelor pe planurile vecine. Prin bogăţia de vase sanguine şi limfatice, ţesutul conjuctiv areolar *intervine în metabolismul local şi general*, permite schimburi active între sînge şi lichidul tisular.

5.4.1.2. Ţesutul conjunctiv dens (Textus connectivus fibrosus)

Este format din aceleaşi elemente ca şi ţesutul conjunctiv areolar, dar la nivelul lui predomină fibrele de colagen care se dispun pe alocuri în mănunchiuri cu orientări determinate de forţele mecanice ce acţionează asupra lui. Între benzile de colagen se pot găsi rare fibre elastice şi de reticulină. Celulele conjunctive sînt reprezentate în special de fibroblaste, dar sînt prezente şi celelalte tipuri de celule conjunctive. Matricea celulară este redusă. Ţesutul conjunctiv dens se găseşte în dermul profund al pielii, în corionul unor mucoase, cum ar fi unele zone ale mucoasei bucale. În aceste structuri, fibrele colagene pot forma fascicule groase de 100 micrometri. Ţesutul conjunctiv dens joacă un rol mecanic important, dar intervine şi în schimburile nutritive, în apărarea tisulară, este rezistent la stres, în comparaţie cu ţesutul conjunctiv areolar. După cum fasciculele de fibre de colagen sînt sau nu orientate, ţesutul conjunctiv dens se împarte în: *a) ţesutul dens neorientat sau neordonat (textus connectivus fibrosus compactus irregularis)*, cu fibrele fără o dispoziţie prea ordonată (fig. 5.26). El se găseşte în dermul pielii, în submucoasa tractului digestiv, în capsulele din jurul organelor. Ţesutul conjunctiv dens din aceste structuri este foarte rezistent. *b)* Cînd fasciculele de fibre de colagen apar orientate, se formează *ţesutul conjunctiv dens orientat sau ordo-*

Fig. 5.26. — Ţesut conjunctiv dens semiorientat.

nat (textus connectivus fibrosus compactus regularis), care este foarte rezistent la forţele de tracţiune. Din această categorie fac parte tendonul, ţesutul conjunctiv lamelar.

5.4.1.2.1. Tendonul (Tendo)

Tendonul (tendo) este un organ conjunctiv cu fibre colagene aşezate paralel între ele şi paralel cu axul mare al fasciculului din care fac parte (fig. 5.27). *Celulele conjunctive sau tenocitele (cellulae tendineae)* derivă din fibro-

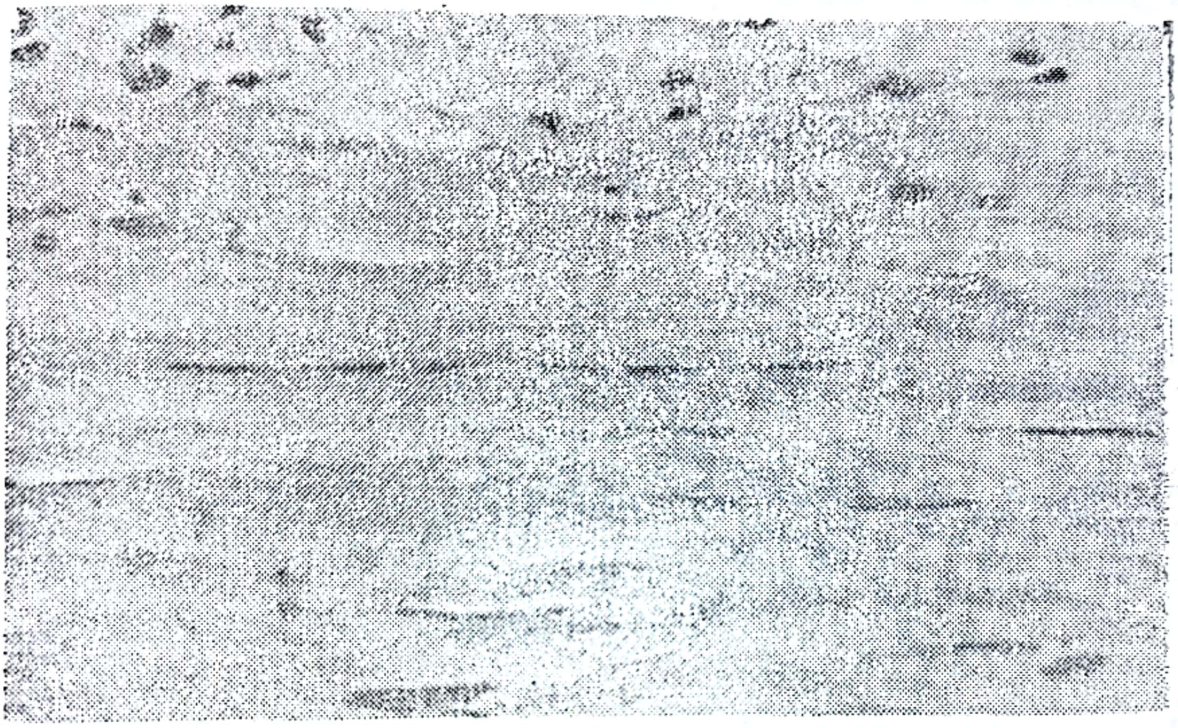


Fig. 5.27. — Tendon, secţiune longitudinală (× 400).

blaste, sînt puţine la număr şi aşezate printre fasciculele colagene paralele. Corpul celulei, lăţit, se aplică pe fasciculul fibrilar lîngă care se găseşte şi trimite prelungiri ce îmbrăţişează coloana de fibre colagene. De aceea pe secţiune transversală ele apar ca celule cu aripi *(celule aliforme)*. Tenocitele se pot divide; celulele-fiice rezultate rămîn apropiate din cauza lipsei de spaţiu, dînd aspectul bigeminat celular. Matricea extracelulară este în cantitate foarte mică (fig. 5.28). Mai multe fascicule de fibre colagene împreună cu tenocitele şi matricea extracelulară respectivă, formează un grup sau *tendon primar*, care este înconjurat de o tunică subţire de conjunctiv lax fibroelastic, numită *endotenonium (endotendineum)*. Mai multe tendoane primare se unesc în *tendon secundar*, înconjurat de o altă teacă conjunctivă, numit *peritenonium (peritendineum)*. Tendoanele secundare realizează tendonul ca organ, fiind şi ele înconjurate cu o teacă conjunctivo-vasculară numită *epitenonium (epitendineum)*. În unele tendoane, teaca externă este formată din două foiţe conjunctive, una fixată pe tendon şi alta pe structura învecinată, iar între ele se găseşte o cavitate tapetată cu mezoteliu, ce conţine un lichid sinovial format din apă, proteine, glicozaminoglicani şi ioni. Acesta

Scanned with OKEN Scanner

lubrefiază cavitatea, permiţînd mişcări de alunecare a tendonului în teaca sa. Tendonul este lipsit de vase, hrănindu-se prin difuziune. El primeşte filete nervoase terminale. Tendonul face legătura dintre mușchi și os, inserîndu-se cu unul din capete pe os, iar cu celălalt capăt fiind legat de mușchi prin joncțiunea miotendinoasă *(junctio myotendinea)*. La realizarea joncțiunii miotendinoase contribuie compuși ai matricei extracelulare din tendon și din

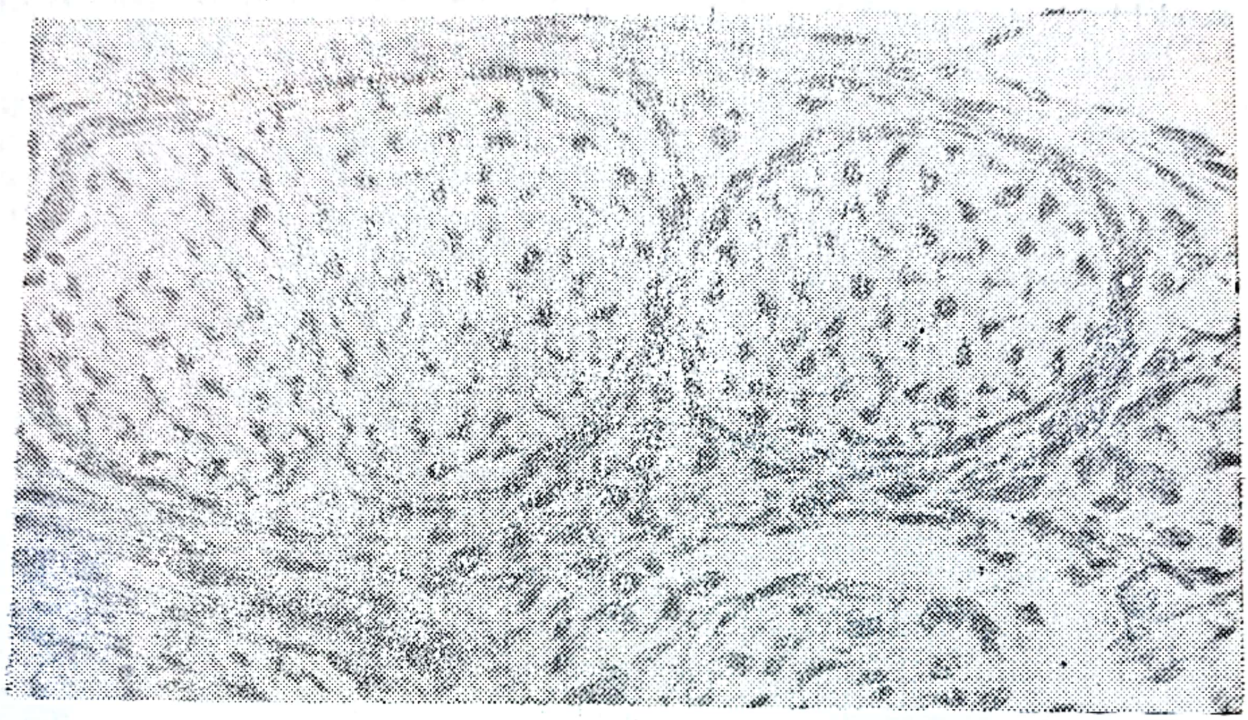


Fig. 5.28. — Tendon, secțiune transversală (× 400).

mușchi (fibronectina, diferite tipuri de colagen, laminina, acetilcolinesteraza, heparan-sulfații, compuși ai endomisiumului). În perioada intrauterină de formare, în tendon apare precoce „antigenul miotendinos" în pericondru, în cartilaj, de unde se extinde gradat la masele premusculare, extracelular, pe endomisium. El are rol important în menținerea legăturii dintre fibrele musculare și fasciculele tendonului.

5.4.1.2.2. Aponevrozele

Aponevrozele acoperă mușchiul sau grupele de mușchi. La om, prezintă în general 2—3 foițe conjunctive suprapuse. În fiecare foiță sau lamă, fibrele colagene sînt așezate paralel între ele și perpendicular pe cele din lama vecină. Între fibre se găsesc fibroblaste turtite, cu forme variate, și puțină matrice extracelulară.

5.4.1.2.3. Țesutul conjunctiv lamelar (Textus connectivus lamellaris)

Este format din lamele conjunctive subțiri, suprapuse concentric, ca foile într-o ceapă. Celulele conjunctive de tip fibroblastic sînt aplatizate pe lamele. Pot fi observate și rare macrofage. Fibrele colagene sînt paralele între ele sau dispuse neorientat în matricea extracelulară. Lîngă ele pot fi

Scanned with OKEN Scanner

observate și foarte rare fibre elastice sau de reticulină. Țesutul lamelar se întîlnește în cornee, în teaca conjunctivă de înveliș a firelor de păr, în teaca nervului (perinevru), în unii corpusculi senzitivi (Vater-Pacini).

5.4.2. ȚESUTURI CONJUNCTIVE CU FUNCȚII SPECIALE

5.4.2.1. Țesutul conjunctiv elastic (Textus connectivus elasticum)

Este alcătuit din fascicule groase de fibre elastice, dispuse paralel între ele și anastomozate în rețea, printre care se găsesc rare fibroblaste turtite. Fasciculele sînt înconjurate de obicei de țesut conjunctiv areolar. Țesutul elastic se întîlnește în ligamentele galbene ale coloanei vertebrale, în corzile vocale adevărate, în ligamentul cefei — rudimentar la om dar dezvoltat la patrupede și în special la bovidee — , în ligamentul suspensor al penisului. Țesutul elastic are culoare galbenă și prezintă un grad mare de elasticitate. El se poate întinde sub influența unor forțe relativ slabe și reveni ușor la lungimea inițială, cînd tracțiunea a încetat. Țesut elastic mai puțin abundent se găsește și în pereții vaselor sanguine, în trahee și în laringe (fig. 5.29).

Fig. 5.29. — Țesut elastic din aortă (× 160).

5.4.2.2. Țesutul conjunctiv reticular (Textus connectivus reticularis)

Se găsește numai în anumite organe, de exemplu în cele hemato- și limfopoietice (măduva roșie hematogenă, ganglioni limfatici, splină). Este format din *celule reticulare* care secretă o matrice fină în jurul fibrelor de reticulină, de-a lungul cărora se găsesc plasate aceste celule și unde își trimit

prelungirile lor. Se creează astfel o pseudorețea fibrilară și celulară flexibilă, în ochiurile căreia se găsesc lichidul tisular și frecvente macrofage active (fig. 5.30).

5.4.2.3. Țesutul conjunctiv mucos (Textus connectivus mucosum)

Conține o cantitate mare de matrice extracelulară, puține fibroblaste mici și rare fibre dar foarte lungi. Acestea sînt reprezentate în principal de fibrele de colagen. La om, țesutul mucos se întîlnește în cordonul ombilical, unde a primit denumirea de gelatina Wharton, precum și în pulpa dinților tineri (fig. 5.31).

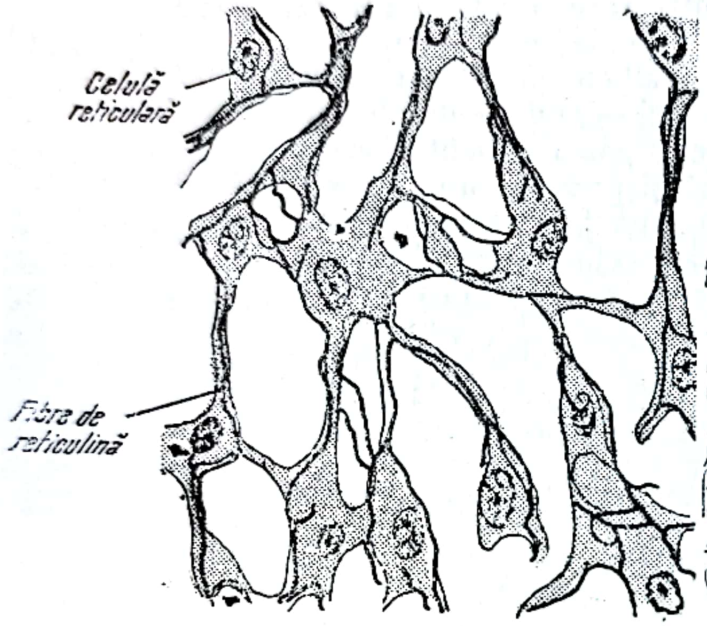


Fig. 5.30. — Țesut conjunctiv reticulat.

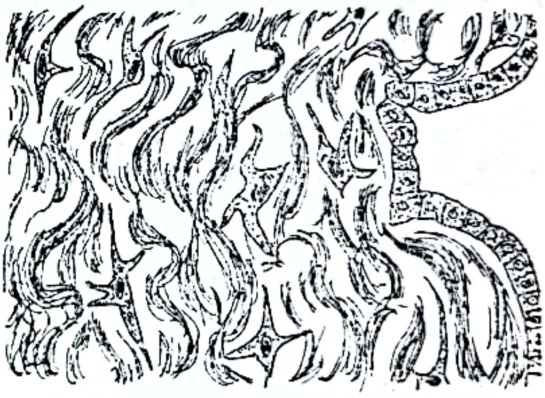


Fig. 5.31. — Țesut conjunctiv mucos: gelatina Wharton.

5.4.2.4. Țesutul adipos (Textus adiposus)

Celula grasă sau adipocitul sau lipocitul, care intră în constituția țesutului adipos, se întîlnește frecvent în țesutul conjunctiv areolar. În unele regiuni ale corpului celulele sînt grupate în număr mare constituind țesutul adipos (fig. 5.32).

Origine. Celulele grase ale țesutului adipos derivă din celulele mezenchimale din care iau naștere și fibroblastele sau celulele endoteliale. Din celulele mezenchimale se vor forma *lipoblaste*, mult asemănătoare fibroblastelor. La om încă din a 30-a săptămînă de dezvoltare embrionară, citoplasma lipoblastelor se încarcă cu picături lipidice, care apoi vor fuziona într-o bulă lipidică unică, ce va ocupa cea mai mare parte a matricei celulare. După naștere, formarea de noi adipocite poate avea loc sporadic, în special în jurul vaselor mici, locuri în care mai persistă celulele mezenchimale izolate. Numărul de adipocite crește pe toată durata dezvoltării intrauterine a embrionului și fătului, dar după naștere celulele adipoase nu mai sporesc numeric, ci se dezvoltă numai prin încărcare cu lipide.

Scanned with OKEN Scanner

Există două tipuri de celule adipoase și, implicit, două categorii de țesut adipos, și anume: *țesutul adipos alb-galben sau unilocular* și *țesutul adipos brun sau multilocular.*

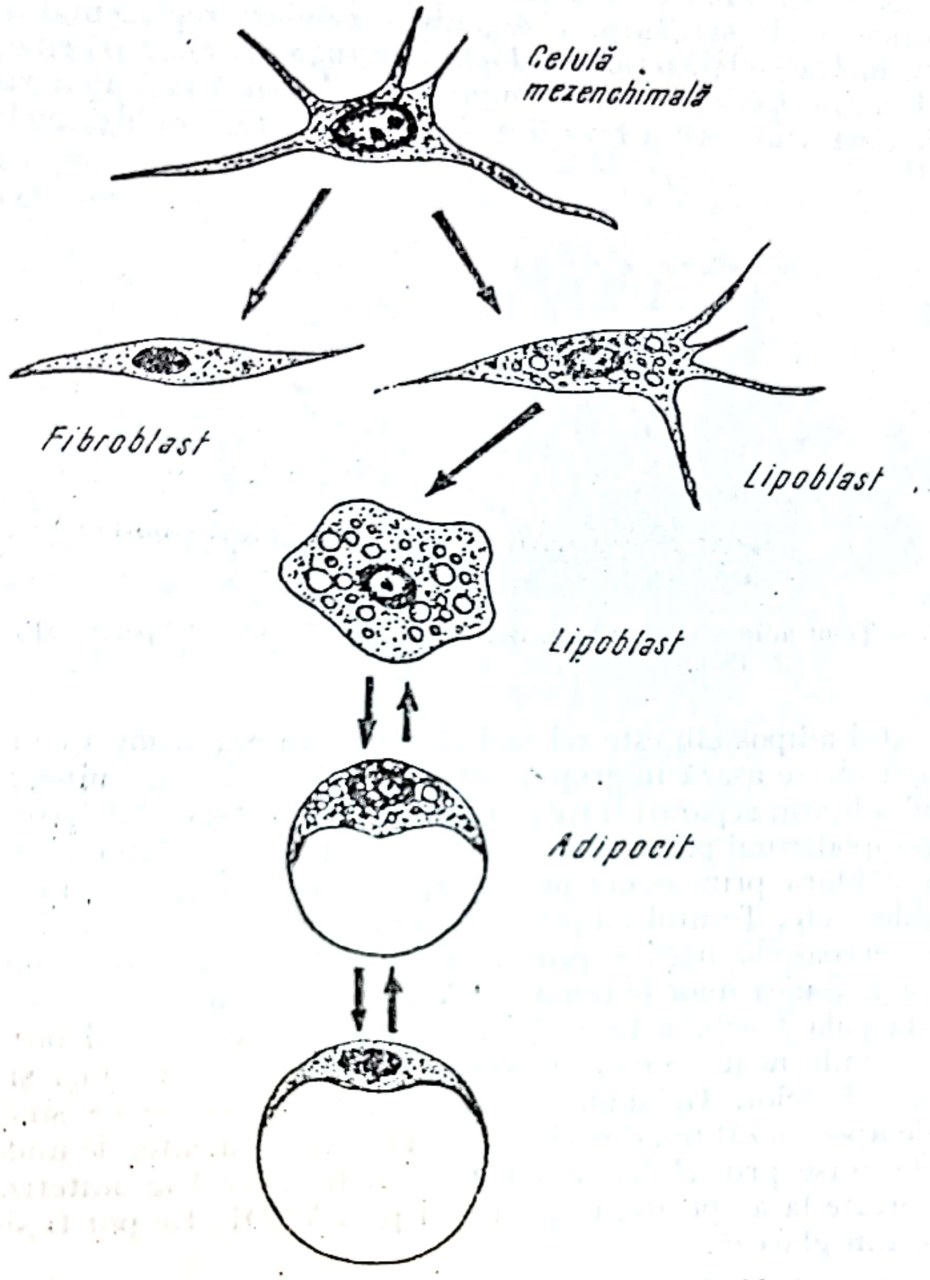


Fig 5.32. — Formarea adipocitelor din lipoblaste.

5.4.2.4.1. Țesutul adipos alb-galben

Țesutul adipos alb-galben prezintă culoare unor modificabilă în funcție de alimentele ingerate, mai ales după consumul de carotenoizi (fig. 5.33 și 5.34). Celula adipoasă alb-galbenă, cu un diametru variabil, cuprins între 50 și 150 micrometri, are forma rotunjită, cînd este izolată, și unghiulară, prin presiune reciprocă, atunci cînd se află în grup compact. Cea mai mare parte a matricei celulare este ocupată de o unică bulă lipidică ce împinge la periferie nucleul și citoplasma; aceasta din urmă apare foarte îngustată, dînd impresia unui inel cu pecete. La nivel ultrastructural se observă însă că în

Scanned with OKEN Scanner

jurul incluziunii lipidice mari pot apărea picături de grăsime mici și izolate. Atît bula lipidică unică, cît și micile picături de grăsime nu sînt înconjurate de endomembrane. Partea cea mai bine reprezentată a citoplasmei se află lîngă nucleu, unde se găsesc și organitele celulare reprezentate prin mitocondrii, complex Golgi, reticul endoplasmic rugos sărac, rari ribozomi liberi. În restul matricei celulare ce înconjură bula lipidică mai apar rari microtubuli, microfilamente și un reticul endoplasmic neted, slab dezvoltat.

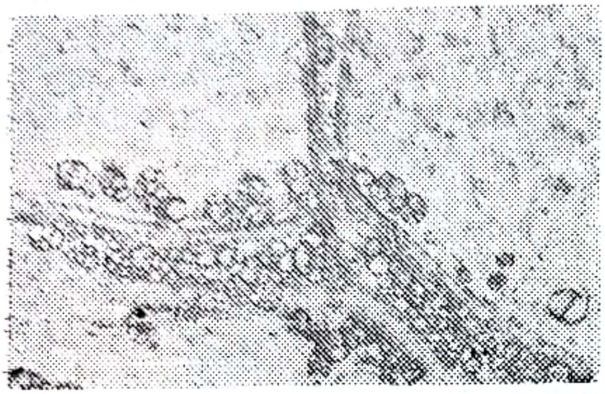


Fig. 5.33. — Țesut adipos alb din mezenter (× 150).

Fig. 5.34. — Adipocit alb (× 900).

Țesutul adipos alb este cel mai răspîndit în organism. Celulele adipoase ce îl constituie se așază în grupuri de-a lungul vaselor sanguine, formînd lobi și panicul adipoși, separați între ei prin septuri fibroase. El apare bine reprezentat în hipodermul pielii, unde constituie un strat izolator ce previne pierderea de căldură prin tegument, în jurul unor organe principale ca ochiul, suprarenalele etc. Țesutul adipos alb este foarte bine vascularizat și inervat de filete nervoase simpatice, provenite din sistemul nervos autonom. El este sensibil la acțiunea unor hormoni ca ACTH, cortizon.

Principala *funcție* a țesutului adipos este aceea de a depozita și metaboliza grăsimile neutre sau trigliceridele (esteri de acizi grași și glicerol) la nivelul adipocitelor. Grăsimile neutre sau trigliceridele ce sînt depozitate (proces de lipogeneză) în adipocite provin fie din alimente, de unde sînt aduse la celulele grase prin chilomicroni, fie din trigliceridele sintetizate în ficat și transportate la adipocite, în principal prin VLDL, fie pot fi sintetizate în adipocite din glucoză.

Chilomicronii, molecule lipoproteice mari, cu diametrul de peste 3 micrometri, sînt formați în intestin. O parte din gliceridele și acizii grași ce rezultă în intestin din scindarea trigliceridelor alimentare, prin acțiunea lipazei pancreatice, formează micelii ce sînt absorbite de enterocite, celule în care se realizează apoi reesterificarea și refacerea trigliceridelor. În același timp, colesterolul absorbit de enterocite este esterificat de enzima acil-CoA-colesterol-acil-transferaza și va forma miezul chilomicronului, înconjurat de trigliceridele refăcute. Fosfolipidele și colesterolul liber împreună cu apolipoproteinele sintetizate de tip B-48, A-I și A-II, formează un monostrat la suprafața chilomicronului. Chilomicronul, format dintr-un miez de colesterol esterificat și grăsimi neutre, înconjurate de un monostrat de colesterol liber, fosfolipide și apolipoproteine, trece în spațiul extracelular, de unde, prin căile limfatice, ductul toracic, ajung în sîngele circulant, implicit în capila-

Scanned with OKEN Scanner

rele sanguine ale țesutului adipos. Chilomicronii sînt reținuți și apoi îndepărtați din circulația sanguină a țesutului adipos prin acțiunea unei enzime *lipoproteinlipaza*, care necesită drept cofactor heparina. Enzima este sintetizată în adipocite și apoi transmisă feței luminale endoteliale a acestor capilare, unde se localizează (fig. 5.35). Lipoproteinlipaza hidrolizează chilomicronii și lipoproteinele plasmatice desfăcînd trigliceridele în acizi grași și glicerol, care intră în celula grasă, unde se reunesc și se depozitează apoi tot ca trigliceride în citoplasmă. Chilomicronii rămași în circulație, fără trigliceride dar bogați în colesterol, pierd apolipoproteinele A-I și A-II, care sînt retransfor-

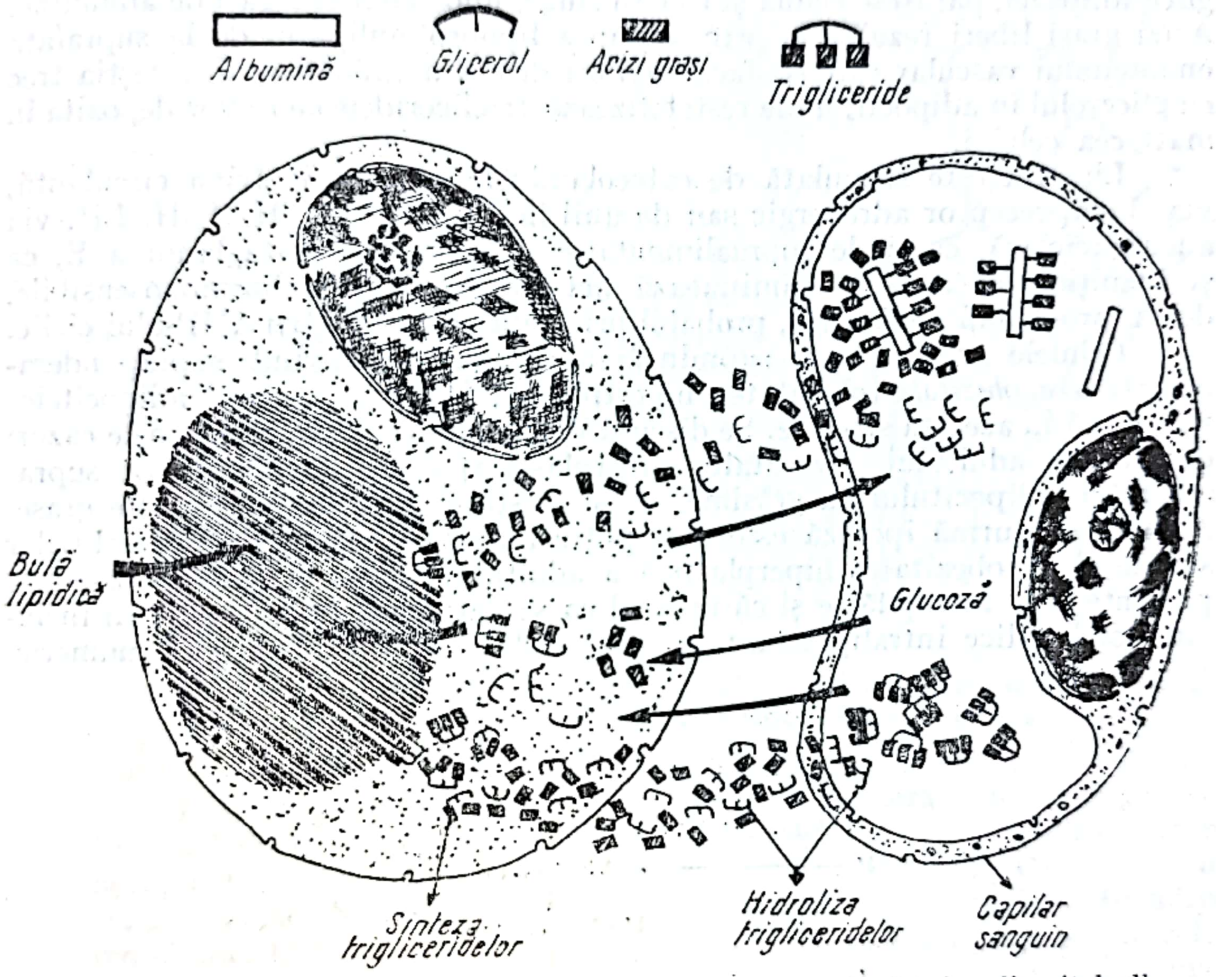


Fig. 5.35. — Diagramă reprezentînd procesul de lipogeneză-lipoliză în adipocitul alb.

mate în HDL. Ei au diametrul de 30—80 nm și se numesc *chilomicroni restanți*. Ei sînt transportați la ficat, unde sînt preluați de hepatocite prin endocitoză mediată de receptori, și hidrolizați în fagolizomi. Colesterolul ce rezultă din desfacerea chilomicronilor restanți este excretat apoi în bilă sau secretat în plasmă în lipoproteine.

În afară de sistemul de transport al lipidelor exogene (ingerate) prin chilomicroni, există și un sistem endogen de transport, reprezentat prin lipoproteine sintetizate în ficat. Acestea sînt VLDL *(very low density lipoprotein)*, principalul transportor IDL *(intermediated density lipoprotein)*, LDL *(low density lipoprotein)* și HDL *(high density liproprotein)*. Acest sistem endogen transportă trigliceridele și colesterolul format în ficat către

Scanned with OKEN Scanner

țesuturile extrahepatice. LDL, în special, aprovizionează țesuturile cu colesterol. El este preluat de către celule prin endocitoză mediată de receptori pentru LDL dar și de către macrofage. Cînd acestea se supraîncarcă cu LDL, care sînt în concentrație ridicată în plasmă, se transformă în *foam cells* (celule spumoase), în special în procesele aterosclerotice.

Acizii grași liberi reprezintă principala sursă de energie. Ei pot lua naștere prin scindarea trigliceridelor ce au fost depozitate în celulele grase *(lipoliza)*, prin acțiunea lipazei *hormonosensibile* (trigliceridlipaza) adipocitară. Din adipocite, acizii grași ce rezultă în urma lipolizei, prin acțiunea trigliceridlipazei, părăsesc celula și trec în sînge, unde circulă legați de albumine. Acizi grași liberi rezultă și prin acțiunea lipoproteinlipazei de la suprafața endoteliului vascular care desface trigliceridele din chilomicroni. Aceștia trec cu glicerolul în adipocit, unde resintetizează trigliceridele ce se vor depozita în matricea celulei.

Lipoliza este stimulată de catecolaminele și norepinefrina circulantă, via $beta_1$-receptor adrenergic sau de unii hormoni ca ACTH, TSH, LH, via adenilatciclază, ca și de supraalimentație. Insulina și prostaglandina E, ca și inaniția sau stresul, diminuează activitatea lipazei hormonosensibile, deci a procesului de lipoliză, probabil prin inhibarea formării AMP-ului ciclic.

Celulele grase se pot supraîncărca cu lipide, generînd supraponderabilitate sau *obezitate* (obezitatea hipertrofică), făcă ca numărul adipocitelor să crească în această situație. Se discută însă și posibilitatea ca în unele cazuri obezitatea adultului (obezitatea hiperplastică) să se datoreze atît supraîncărcării adipocitului cu grăsime, cît și creșterii numărului de celule grase. Această din urmă ipoteză este însă puțin admisă, majoritatea specialiștilor susținînd că obezitatea hiperplastică a adultului are ca origine o obezitate prezentă încă în copilărie și că în final ea se datorează numai creșterii incluziunilor lipidice intralipocitare, fără ca celulele grase să sporească numeric.

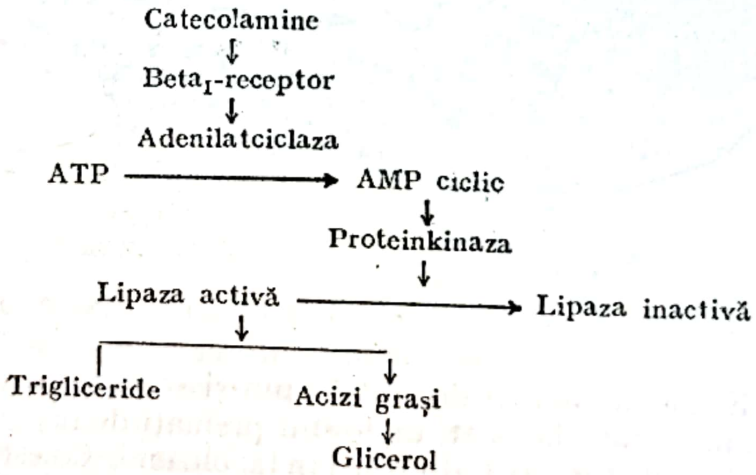


Fig. 5.36. — Activarea lipazei din celulele adipoase de către catecolamine.

5.4.2.4.2. Țesutul adipos brun

Este format din celule adipoase de culoare întunecată, datorită unui conținut ridicat de citocrom în mitocondriile din citoplasmă. Celula adipoasă brună, de formă poligonală sau ușor rotunjită, este bogată în picături lipidice izolate, de mărimi diferite, de unde denumirea de multiloculară. Celula

Scanned with OKEN Scanner

are un nucleu situat central, un număr crescut de mitocondrii cu criste numeroase lamelate, ribozomi în număr mare și un reticul endoplasmic slab dezvoltat (fig. 5.37).

Țesutul adipos brun este bine reprezentat la embrion și nou-născut, scade treptat odată cu înaintarea în vîrstă, iar la adult este înlocuit treptat cu țesut adipos alb. La nou-născut principalele depozite de țesut adipos brun se găsesc în regiunea cervicală posterioară, axilară și perirenală. Depozite mai mici sînt prezentate în zonele interscapulare, în mediastinul anterior, în zonele intercostale, în abdomenul anterior și în zona retropubiană. El pare

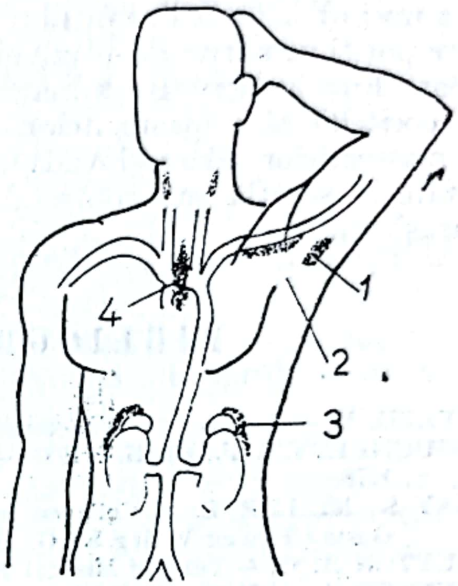


Fig. 5.37. — Schema regiunilor din organism în care se găsește țesut adipos brun.

să aibă un rol important în adaptarea extrauterină a nou-născutului. Țesutul adipos brun este dezvoltat la animalele care hibernează, la care este și denumit impropriu glanda hibernantă.

Funcția țesutului adipos brun este de a genera căldură organismului. Procesul de termogeneză este stimulat de frig, care determină eliberarea de norepinefrină în țesuturi de către filetele nervoase simpatice ce înconjură celulele grase. Norepinefrina activează lipaza hormonosensibilă din adipocite, mobilizînd trigliceridele, pe care le hidrolizează în acizi grași și glicerol. Față de alte celule, în celulele adipoase brune la nivelul mitocondriilor, mai ales în cazul stimulării prin frig, procesul de fosforilare este slab cuplat cu oxidarea, ceea ce face ca prin această acțiune de necuplare, oxidarea lanțurilor lungi de acizi grași eliberați să se desfășoare cu viteză crescută. În același timp insuficiența fosforilării oxidative face să nu se sintetizeze molecule ATP și astfel toată energia să fie îndreptată spre eliberarea de căldură. În aceste situații și consumul de oxigen este crescut la nivelul celulelor grase brune. Producerea de căldură determină ridicarea temperaturii țesutului adipos brun și, implicit, a sîngelui din vasele sanguine ce sînt cuprinse în grosimea lui. Ca o consecință, depozitele lipidice intracelulare scad, pentru a se reface însă la o temperatură exterioară obișnuită, cînd și mitocondriile acționează la fel ca în alte celule, desfășurînd un proces normal de cuplare a oxidării cu fosforilarea. Depozitul lipidic al celulelor adipoase brune nu se modifică decît foarte puțin în stările de inaniție sau în supraalimentație, spre deosebire de

celulele adipoase albe, în care procesul de lipoliză-lipogeneză devine foarte activ și în aceste condiții.

Inervația țesutului adipos apare foarte bogată, fiind reprezentată prin fibre și terminații nervoase colinergice și adrenergice. Cercetările histochimice ample, întreprinse de Diculescu și colab. (1970—1975), au stabilit existența în țesutul adipos alb a unor rețele colinergice sub formă de plexuri perivasculare, iar în ochiurile acestei rețele — mastocite, în contact intim cu fibrele nervoase și terminațiile lor. Din rețeaua nervoasă pericelulară se detașează fibre destinate adipocitelor, care se termină în coșuleț, în jurul acestora. Cercetările autorilor sus-menționați demonstrează prezența în țesutul adipos și a unei abundente inervații adrenergice, sub formă de plexuri perivasculare, care pot fi urmărite de-a lungul vaselor de toate calibrele, chiar și al capilarelor. Fibrele nervoase adrenergice stabilesc contacte directe cu suprafața adipocitelor și a mastocitelor. Inervația funcțională bogată a adipocitelor și mastocitelor aduce dovada unei intense activități a acestor celule, activitate ce se află sub controlul permanent al sistemului nervos simpatic și parasimpatic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

CVAPIL M.—Physiology of connective tissue, Butterworth et Co. (Publishers) Ltd., Londra 1977.

DOUGHERTY T. F., BERLINE D. — Treatise on collagen, Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1978.

GAY S., MILLER E. — Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue, Gustav Fischer Verlag K. G., Stuttgart, 1978.

GUYTON A. G. — Text of Medical Physiology, Saunders Comp. W. B., Philadelphia, 1985.

HUNTER J. — Intern. Rev. Connect. Tiss. Res., Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1973.

KIVIRICKO K. — Connective Tissue, Biochemistry and Pathophysiology, Springer Verlag GmbH., Hamburg, 1974.

KLEINMAN H. și colab. — Role of Collagenous Matrices in the Adhesion and Growth of Cells, *J. cell. Biol.*, 1981, 88, 473.

ROBERT A. M. și colab. — Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1970.

ROSS R. — Rhe Elastic Fiber, *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 199.

SANDBERG L. și colab. — Elastin Structure, Biosynthesis and Relation to Disease States, *New Engl. J. Med.*, 1981, 304, 566.

SIMIONESCU N. și colab. — Morphometric Data on the Endothelium of Blood Capillaries, *J. cell. Biol.*, 1974.

WEISS (sub red.) — Histology, Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1984.

WASSERMAN S. I. — The Mast Cell and the Inflammatory Response, Pitman medical Publishing Co., Ltd., Londra, 1979.

Scanned with OKEN Scanner

ȚESUTURILE DE SUSȚINERE (DE SUPORT)

6.1. ȚESUTURILE CARTILAGINOASE (TEXTUS CARTILAGINEUS)

Cartilajul reprezintă unul din țesuturile semirigide și semidure din organism. El se formează din țesutul conjunctiv, sub influența unor factori mecanici ce acționează în unele condiții asupra lui.

Țesutul cartilaginos se formează din țesutul mezenchimal prin diferențierea celulelor mezenchimale și condroblaste. Inițial se formează un precartilaj, în care condroblastele încep să sintetizeze și să secrete matrice în spațiul extracelular. În același timp din mezenchimul care înconjură precartilajul se formează o membrană conjunctivo-vasculară numită pericondru.

Țesutul cartilaginos este de trei feluri: hialin, elastic și fibros.

6.1.1. CARTILAJUL HIALIN (CARTILAGO HYALINA)

Este cel mai bine reprezentat în organism. Se găsește sub formă de cartilaj articular pe capetele oasoase ale articulațiilor, în septul nazal, laringe, trahee, bronhii mari, cartilaje costale. Se găsește de asemenea pînă la vîrsta de aproximativ 25 de ani între epifizele și diafiza oaselor lungi, asigurînd creșterea lor în lungime. În timpul dezvoltării intrauterine, formează scheletul primitiv al embrionului, care treptat va fi înlocuit cu țesut osos. Cartilajul hialin este semitransparent avînd o nuanță de albastru-cenușiu.

6.1.1.1. Particularități morfologice

Cartilajul hialin este format din *celule (cellulae cartilaginis)* și matrice intercelulară sau *matrice cartilaginoasă (substantia fundamentalis cartilaginea)*.

Celulele cartilajului hialin, numite și *condrocite* (adulte) sau *condroblaste* (tinere sau în activitate secretorie intensă), sînt așezate în cămăruțe sau lacune existente în matrice, numite și *condroplaste (lacuna cartilaginea)*. Celulele pot fi dispuse în aceste lacune fie izolat, fie grupat în *grupuri izogene*

Scanned with OKEN Scanner

(aggregatis chondrocytica) de 4—8 celule în grup. Dispunerea lor în grup se poate face fie într-un singur ax, o celulă peste alta, realizînd *grupul izogen axial* (în cartilajele ce se osifică), fie în mai multe axe radiare, realizînd grupul *izogen coronar* (în cartilajele costale). Diametrul condrocitului este variabil, ca și forma sa. Atunci cînd celula este singură în lacună, prezintă o formă rotunjită sau ovalară. În grup izogen fiind asociate mai multe celule, prin compresiune reciprocă ele dobîndesc forme unghiulare. Nucleul lor este rotund și prezintă uneori un nucleol excentric. Adeseori și nucleul este deplasat către periferia celulei (fig. 6.1). Citoplasma condrocitelor conține un re-

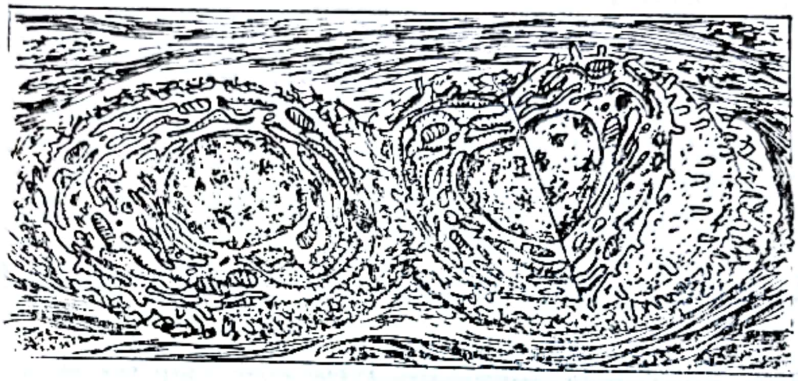


Fig. 6. 1. — Schema organizării ultrastructurale a condroblastului.

ticul endoplasmic rugos și un complex Golgi bine dezvoltat; de asemenea lizozomi, robozomi neatașați de membrane, frecvente mitocondrii alungite și numeroase microfilamente. Citoplasma conține în plus incluziuni proeminente de glicogen și abundente picături mari lipidice, considerate a constitui depozite de rezervă pentru celulă, ce se pot mobiliza ușor în fazele de activitate celulară intensă. Cu cît celula este mai activă, cu atît organitele citoplasmatice sînt mai abundente. La nivelul ei se secretă componentele moleculare ale matricei cartilaginoase (glicozaminoglicani și colagen tip II). Condrocitele tinere sînt turtite, mai mici decît cele adulte și se pot divide mitotic. Afinitatea condrocitelor pentru coloranți crește pe măsura maturării lor (fig. 6.2).

Matricea cartilaginoasă este alcătuită din fibre de colagen fine, cuprinse în matricea extracelulară propriu-zisă, matrice bogată în glicozaminoglicani și proteoglicani.

Fibrele de colagen sînt dispuse printre condrocite, adesea sub formă de evantai. În cartilajul hialin normal, ele nu pot fi observate din cauza diametrului lor submicroscopic (20—30 nm) și a indicelui de refracție comun cu cel al matricei extracelulare.

Fibrele apar numai după îndepărtarea matricei prin tripsinizare sau cu soluții saline concentrate.

În jurul lacunelor, fibrilele de colagen sînt și mai subțiri formînd o rețea ce înconjură grupul izogen sau condrocitul izolat. Această zonă matriceală pericelulară, numită *matrice teritorială (matrix territorialis cellulorum)*, groasă de 1—3 micrometri, se colorează mai intens decît matricea din restul cartilajului. Matricea teritorială apare intens PAS-pozitivă și cu o metacromazie

pronunțată, datorită prezenței la acest nivel a unei concentrații mai mari de condroitin-sulfat. Ea are rol important în controlul și *turnover*-ul matricei cartilaginoase.

Între grupele izogene matricea cartilaginoasă, numită și *matrice interteritorială (matrix interteritorialis)*, apare mai slab colorată. Este groasă de aproximativ 50 micrometri și diferă adeseori ca microstructură de matricea

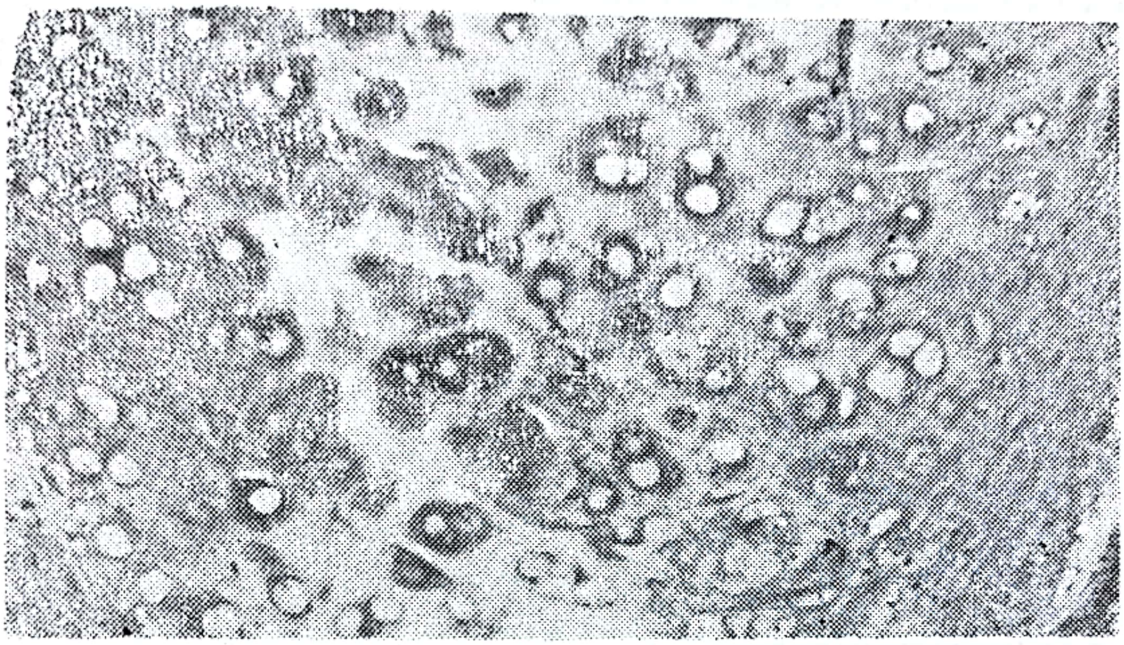


Fig. 6. 2. — Cartilaj hialin (× 125).

teritorială. Fibrilele de colagen sînt constituite predominant din colagen tip II (format din trei lanțuri alfa$_1$ tip II [alfa$_2$ (II)]$_3$, care reprezintă 80—90% din totalul colagenului din cartilaj. În cartilajul articular au fost izolate recent și așa-numitele colagene minore, localizate în matrice. Unele din aceste molecule, cu lungimea egală cu jumătate din molecula de colagen tipică, au fost numite colagen tip X. Colagenul X este localizat în zonele din jurul condrocitelor hipertrofiate. S-au mai indentificat de asemenea și alte peptide colagene, respectiv G, H, J, sintetizate de condrocitele cultivate *in vitro*. Acestea însă prezintă particularități care le deosebesc de colagenul cartilaginos tip II. În cartilajul hialin colagenul formează o rețea în care se găsesc proteoglicani, rețea ce contribuie la proprietățile mecanice și fiziologice ale cartilajului. Tipul II de colagen influențează diferențierea condrogenică ca și reglarea fenotipului condrocitar. Tipul II de colagen este ancorat strîns la suprafața condrocitului. Adeziunea este facilitată de unele proteine aflate la suprafața membranei celulelor cartilaginoase cum ar fi *condronectina*, *ancorina*.

În afară de colagen, proteoglicanii reprezintă componentul major al matricei intercelulare și al cartilajului hialin. Proteoglicanii din cartilaj sînt reprezentați prin monomeri de proteoglicani, a căror structură și greutate moleculară variază foarte mult, și prin agregate de proteoglicani. Proteoglicanul monomer este format dintr-un miez proteic cu greutatea moleculară de aproximativ de 200 000, de care se prind, prin legături covalente, lanțurile de condroitin sulfați și keratan sulfați. Agregatele de proteoglicani sînt formate din proteoglicani monomeri, care pot să fie pînă la 140/moleculă gi-

Scanned with OKEN Scanner

gantă, legați de acidul hialuronic prin partea lor proteică, printr-o regiune de legare la acidul hialuronic. Aranjarea monomerului, ce se face la intervale regulate, variind între 25 și 85 nm, este stabilizată de molecule numite *proteine de legare (link proteins)*. Există diferențe de organizare structurală intimă, concentrație și tip de monomeri între agregatele de proteoglicani ale cartilajelor hialine din diferitele regiuni unde acestea se află, sau chiar în același cartilaj. În mod normal concentrația de glicozaminoglicani este mai scăzută la suprafața cartilajului articular decît în profunzimea lui, sau concentrația de keratan sulfați, ca și lungimea lanțurilor de condroitin sulfat, cresc în agregate odată cu îngroșarea suprafeței cartilajului articular. Există de asemenea diferențe de concentrație și de componență a agregatelor de proteoglicani între zonele matricei teritoriale (pericelulare) și interteritoriale (între grupele de celule). Hialuronatul joacă un rol important prin interacțiunile sale cu proteoglicanii, mediind retenția acestora la suprafața condrocitelor, sinteza și secreția lor. Proteoglicanii pot fi adeseori legați de fibrele de colagen, mai strîns în matricea teritorială și mai lax în matricea interteritorială. Proteoglicanii au mare afinitate pentru apă și ioni. Apa devine parte integrantă a țesutului cartilaginos, contribuind la realizarea rigidității lui și, în același timp, la menținerea unui înalt grad de flexibilitate a acestuia. Rigiditatea și flexibilitatea diferă de la un cartilaj hialin la altul, în raport cu diferența componenței matricei cartilaginoase, a proporției dintre apă, colagen, acid hialuronic, proteoglicani monomeri și agregate de proteoglicani.

Pericondrul (perichondrium). Cu excepția cartilajului articular, toate celelalte cartilaje hialine sînt învelite la periferie de o foiță conjunctivă numită pericondru. Aceasta prezintă un strat intern *(stratum cellulare)*, bogat celular (zonă condrogenică), unde se formează prin mitoză noi celule cartilaginoase, și un *strat extern (stratum fibrosum)* cu numeroase fibroblaste turtite, fibre de colagen tip I și vase sanguine. Între pericondru și cartilaj nu există o delimitare, ci se trece treptat de la celule de tip fibroblastic la celule condrocitare.

6.1.1.2. Creșterea cartilajului

Creșterea cartilajului sau condrogeneza se realizează prin două mecanisme independente care se pot desfășura în același timp. Creșterea *aposițională* presupune adăugarea (apoziția) de noi straturi de matrice la suprafața cartilajului deja format. Noul țesut cartilaginos este format de către celulele stratului intern condrogenic al pericondrului. Creșterea *interstițială* se întîlnește mai frecvent în cartilajele tinere și se datorește condroblastelor ce se divid mitotic și secretă în jurul lor matrice după fiecare diviziune celulară. Creșterea cartilajului este influențată de vitamine — vitamina A (activitatea mitotică), vitamina C (sinteza substanței fundamentale), vitamina B (maturarea fibrelor de colagen) și hormoni: somatotropul, testosteronul, estrogenii au efect stimulator, în timp ce cortizolul și hidrocortizonul au efect inhibitor asupra creșterii cartilajului.

6.1.1.3. Nutriția cartilajului

Nutriția cartilajului se realizează prin inhibiție și difuziune de la vasele sanguine ale pericondrului, deoarece cartilajul este avascular (nu con-

Scanned with OKEN Scanner

ține capilare). Vasele mari pot să-l străbată fără să-i asigure hrana. Din cartilaj lipsesc și vasele limfatice.

Matricea intercelulară permite trecerea cu ușurință a lichidelor către condrocite. Viteza cu care se propagă acestea depinde de concentrația și felul substanțelor solvite în ele, de concentrația și organizarea proteoglicanilor, de vîrsta cartilajului (un cartilaj tînăr este străbătut mai ușor de apă și solviți).

6.1.1.4. Modificări în raport cu vîrsta

La persoanele în vîrstă cartilajul degenerează, activitatea de sinteză a condrocitelor scade, ceea ce duce la reducerea formării componentelor maticei extracelulare. Uneori matricea cartilaginoasă capătă o aparență fibroasă, asemănătoare plăcilor de azbest (degenerescență azbestică) cu calcifiere. Adeseori, datorită unei vascularități mai slabe, unele condrocite degenerează și pier. Pot apărea în procesul îmbătrînirii și calcifieri ocazionale ale cartilajului. Dacă în aceste zone pătrund și vasele sanguine, cartilajul se transformă în țesut osos.

Capacitatea de *regenerare a cartilajului* la adult este destul de redusă și de ea depind integritatea și buna funcționare a pericondrului. La copii puterea de regenerare a cartilajului este foarte mare. Pericondrul poate reface zone mici de cartilaj — de exemplu în cazul fracturilor acestuia. Cînd din cartilaj se pierd teritorii mai întinse, pericondrul le reface prin formare de țesut conjunctiv dens.

6.1.2. CARTILAJUL ELASTIC (CARTILAGO ELASTICA)

Cartilajul elastic se găsește în epiglotă, în unele cartilaje laringiene (aritenoid), în pavilionul urechii (fig. 6.3). Structura este asemănătoare cu a cartilajului hialin, dar conține un număr mai mare de celule și, în afară de

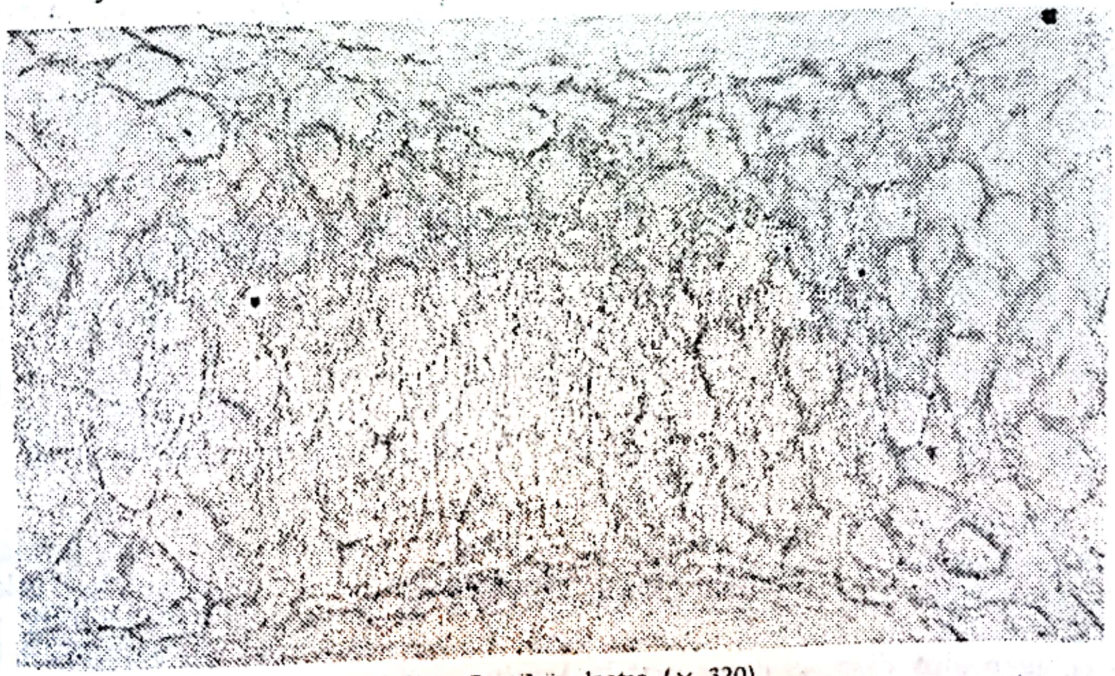


Fig. 6. 3. — Cartilaj elastic (× 320).

Scanned with OKEN Scanner

fibrele de colagen tip II, se găsește și un număr apreciabil de fibre elastice izolate sau în mănunchiuri, care înconjură și separă între ele grupele izogene. Cartilajul elastic crește mai mult în apoziție decît interstițial. Este mai puțin susceptibil la degradare în procesul de îmbătrînire a organismului. Nu se osifică și numai excepțional se calcifiază.

6.1.3. CARTILAJUL FIBROS SAU FIBROCARTILAJUL (CARTILAGO FIBROSA)

Cartilajul fibros sau fibrocartilajul (*cartilago fibrosa*) este puțin reprezentat în organism. Se găsește în discurile intervertebrale, în unele cartilaje articulare, în simfiza pubiană (fig. 6.4). La nivelul articulațiilor este asociat cu cartilajul hialin, uneori unul în continuarea celuilalt. Fibrocartilajul

Fig. 6. 4. — Schema organizării structurale a fibrocartilajului.

este întotdeauna asociat cu țesut conjunctiv dens, fără limită de demarcație între ele. Fibrocartilajul este format, ca și cartilajul hialin sau elastic, din condrocite și matrice cartilaginoasă. Condrocitele sînt rare, așezate în coloane. Fibrele de colagen sînt abundente, paralele între ele și cu așezare în benzi oblice unele față de celelalte, dînd un aspect penat. În unghiurile formate de aceste benzi colagenice se găsesc plasate condrocitele. Matricea intercelulară și interfibrilară este redusă. Fibrocartilajul nu are pericondru; el se dezvoltă din țesutul conjunctiv dens, prin diferențierea fibroblastelor în condrocite. Fibrocartilajul este foarte rezistent și nu se deformează la presiuni mari.

Fig. 6. 5. — Schema structurii discului intervertebral.

Discul intervertebral, situat între corpurile a două vertebre, este format dintr-un inel fibros la periferie și un nucleu pulpos în centru (fig. 6.5). Inelul fibros *(annulus fibrosus)* are un strat extern de țesut conjunctiv fibros și fibrocartilaj în cea mai mare parte a lui. În fibrocartilajul respectiv, fibrele de colagen sînt dispuse octogonal la lamine adiacente. Acest aranjament

Scanned with OKEN Scanner

conferă fibrocartilajului o mare rezistență la presiunile puternice generate în coloană, între vertebre. Nucleul pulpos, central, derivă din notocord. Este format din celule rotunde, înconjurate de un fluid siropos, amorf, bogat în acid hialuronic. El acționează local ca o pernă flexibilă.

La copil, nucleul pulpos este larg, în timp ce la adult se reduce treptat, fiind înlocuit cu fibrocartilaj. În unele cazuri inelul fibros se rupe, de cele mai multe ori în regiunea sa posterioară. Ca urmare, lichidul nucleului pulpos este expulzat iar discul intervertebral se turtește și se dislocă, alunecînd dintre vertebre. În noua situație, poate comprima nervi, dînd dureri și tulburări neurologice; cel mai des aceste discopatii apar în regiunea lombară.

6.2. ȚESUTURILE OSOASE (TEXTUS OSSEUS)

6.2.1. GENERALITĂȚI. DEFINIȚIE

Țesutul osos este cel mai dur țesut din organism. El se formează, ca și cartilajul, prin metaplazia țesutului conjunctiv sub influența a diferiți factori mecanici. Țesutul osos alcătuiește scheletul organismului. În diferite condiții patologice însă, mici fragmente de țesut osos pot apărea și în țesuturi sau organe în care în mod normal nu există. În afară de rolul mecanic pe care îl îndeplinește în organism, țesutul osos ia parte și la metabolismul general, el fiind un rezervor de calciu. La nivelul țesutului osos au loc schimburi active ionice cu mediul periosos.

6.2.2. STRUCTURA ȚESUTULUI OSOS

Țesuturile osoase se prezintă sub formă de:

— țesut osos haversian sau compact *(os compactum)*;

— țesut osos spongios sau trabecular *(os spongiosum = trabeculare)*.

În structura celor două tipuri de țesut osos se găsesc aceleași elemente componente dar în proporții și aranjamente diferite.

Țesuturile osoase sînt alcătuite din *celule osoase* și *matricea osoasă* ce conține substanța fundamentală preosoasă (oseina), fibrele conjunctive și cristalele de hidroxiapatită. Repartizarea lor cantitativă și structurală este caracteristică pentru fiecare tip de țesut osos. După *vîrstă*, țesutul osos se împarte în *țesut osos imatur* sau *primar*, în care fibrele de colagen sînt așezate dezordonat în matrice, *și țesut osos matur*, *secundar* sau *lamelar*, în care fibrele de colagen sînt dispuse în lamele osoase într-un mod organizat. În rest, componenta lor structurală este asemănătoare.

6.2.2.1. Celulele osoase

Sînt reprezentate prin osteoblaste, osteocite și osteoclaste.

Scanned with OKEN Scanner

6.2.2.1.1. Osteoblastul (Osteoblastus)

Osteoblastul (*osteoblastus*) este celula formatoare de os. Ea se diferențiază din celulele osteoprogenitoare. Are formă poliedrică (cuboidă, de obicei). Din corpul celulei pleacă în toate direcțiile mici prelungiri. Nucleul este rotund, așezat central, eucromatic, cu 1—2 nucleoli. Citoplasma intens bazofilă conține un bogat RER, mitocondrii numeroase și un complex Golgi foarte dezvoltat. Celula are o puternică activitate fosfatazică alcalină. În osteoblastele active, citoplasma conține și granule PAS-pozitive, care reprezintă probabil precursorii glicozaminoglicanilor destinați matricei pericelulare. Osteoblastul desfășoară o bogată activitate de sinteză, fiind celula responsabilă de formarea matricei preosoase sau oseina. Osteoblastul secretă predominant pentru matricea preosoasă molecule de colagen tip I și molecule proteice necolagene, cum sînt osteonectina, proteoglicani osoși și sialoproteina osoasă. În matricea nou-formată se vor depune, sub formă de cristale de hidroxiapatită, săruri minerale, reprezentate în principal de fosfați și carbonați de calciu, și, în cantități foarte reduse, de magneziu, fier, citrați. În momentul în care osteoblastul s-a înconjurat de matricea preosoasă în care au început să apară nucleele de depunere minerală, osteoblastul își reduce, în citoplasmă, aparatul organitic de sinteză și se transformă în celulă osoasă adultă (osteocit) ce rămîne inclusă în lacunele țesutului nou-format.

O parte din osteoblastele situate la periferia țesutului osos, după ce au format matricea, se retrag mereu, pentru ca la sfîrșitul osteogenezei să se retransforme în celule osteogene sau osteoprogenitoare localizate în periost și endost. Acestea se reactivează din nou în fracturile osoase.

6.2.2.1.2. Osteocitul (Osteocytus)

Osteocitul (*osteocytus*) reprezintă stadiul final al maturizării osteoblastelor. El este slab bazofil și în general, de talie mai mică decît osteoblastul.

Osteocitele sînt localizate în cămăruțe sau lacune (osteoplaste) săpate în matricea osoasă. În jurul unora din ele, un strat osteoid, puțin mineralizat, separă osteocitele de restul țesutului osos dur, ce înconjură fiecare lacună. Osteocitele sînt celule diferențiate ce nu se mai divid, astfel că fiecare lacună conține o singură celulă. Lacunele au formă alungită, pînă la 20—40 micrometri și o lărgime de 6—15 micrometri. De la fiecare lacună pornesc în toate direcțiile canalicule osoase, ce se anastomozează cu canaliculele cămăruțelor învecinate. În aceste lacune, osteocitul prezintă o formă ovoidă sau turtită, alungită. Corpul celular trimite prelungiri ce pătrund în canaliculele osoase și vin astfel în contact cu prelungirile osteocitelor vecine. Citoplasma osteocitelor conține organite celulare reprezentate printr-un RER redus, o zonă Golgi mică, rari ribozomi, lizozomi. Celulele desfășoară o activitate de sinteză mai redusă dar care permite participarea destul de activă la schimburile cu peretele osos înconjurător. Durata de viață a osteocitelor în țesutul osos este diferită, de la cîteva zile — în discul epifizar — pînă la cîteva luni — în osul compact haversian.

6.2.2.1.3. Osteoclastul

Osteoclastul este o celulă policariocitară, de talie mare, avînd în citoplasmă 10—60 de nuclei. Celulele se găsesc aplicate pe suprafața spiculilor sau trabeculelor osoase sau, frecvent, în depresiuni ale acestora, numite lacu-

Scanned with OKEN Scanner

nele Howship (fig. 6.6). Prezintă înspre țesutul osos un pol activ, ce constituie *suprafața de resorbție*. Această față care este implicată în resorbția surplusului de os sau a zonelor de matrice osoasă deficitară ce trebuie îndepărtată, se numește margine *convolută* sau *plisată*, formată din prelungiri celulare asemănătoare degetelor. Sub marginea plisată apare o regiune citoplasmatică numită *zona clară*, ce nu conține organite citoplasmatice și numai microfilamente abundente. Sub marginea plisată și zona clară se află *regiunea veziculară* cu citoplasma încărcată de vezicule de formă și mărimi diferite. La polul opus marginii dințate, departe de os, este regiunea bazală a osteoclastului care conține nucleii, mitocondriile, RER, numeroși saci golgieni și numeroși lizozomi. În citoplasma acidofilă mai pot fi observate cristale de calciu, iar în apropierea celulei — fibre de colagen dezintegrate.

Fig. 6. 6. — Schemă electronooptică a osteoclastului.

Funcția. Osteoclastul este celula resorbtivă din țesutul osos. Acțiunea ei este maximă în perioadele de osteogeneză. Îndepărtarea surplusului matricei osoase mineralizate se efectuează într-un proces combinat. În primul moment are loc o decalcifiere focală, datorată acizilor organici excretați de către osteoclast prin marginea plisată, care creează un pH acid suficient pentru demineralizarea matricei. În al doilea moment intervine digestia extracelulară a matricei osoase de către hidrolazele acide lizozomale, eliberate și exocitate în mediul extracelular tot prin marginea plisată. Celula conține în principal fosfataza acidă și colagenaza. Digestia intracelulară a matricei este mai redusă. O altă activitate osteoclastică este legată de prezența numeroaselor microfilamente de actină, din zona clară a celulei, care determină o activitate contractilă celulară, o înlesnire a atașării osteoclastului la peretele osos, precum și producerea unor mișcări la nivelul marginii plisate care să ușureze resorbția. De asemenea se pare că osteoclastul este o celulă secretorie, dovadă organitele de sinteză numeroase, bine reprezentate în zona profundă, bazală, a celulei osteoclastice.

Originea osteoclastelor. Pînă de curînd ele au fost socotite a avea origine comună cu a osteoblastelor și osteocitelor, și anume celulele osteogene sau osteoprogenitoare aflate în periost și endost. Cercetările din ultimii ani

Scanned with OKEN Scanner

au adus probe suficiente care stabilesc că osteoclastele provin din monocitele sanguine direct prin fuziunea lor, fie înainte, fie după ce acestea s-au transformat în macrofage, în afara vaselor. Astfel, osteoclastele nu aparțin liniei celulare osoase, ci se integrează în sistemul monocito-macrofag al organismului.

6.2.2.2. Matricea osoasă

Este alcătuită în părți egale din *substanță organică și anorganică. Substanța organică* conține 95% fibre de colagen tip I și glicozaminoglicani, dispuși în spațiile dintre fibre. Glicozaminoglicanii sînt reprezentați în special prin condroitin-4-sulfați, condroitin-6-sulfați și keratan-sulfați. *Partea anorganică* a matricei osoase este formată în principal din calciu și fosfor care se depozitează de-a lungul fibrelor de colagen sub formă de *cristale de hidroxiapatită*, lungi de 6—7 nm, avînd în general formula $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. În jurul cristalelor de hidroxiapatită se găsește un strat de apă și ioni, numit *stratul de hidratare*, care permite efectuarea ușoară a schimburilor de ioni între cristale și fluidele organismului. Asocierea hidroxiapatiei cu fibrele de colagen conferă densitate și rezistență țesutului osos. În matricea osoasă se mai găsesc în cantitate mai mică și ioni de magneziu, potasiu, sodiu, citrați, bicarbonat. Matricea organică preosoasă este sintetizată și secretată de osteoblaste.

6.2.3. TIPURI DE ȚESUT OSOS

6.2.3.1. Țesutul osos haversian (compact)

Este cel mai răspîndit în organism. El formează diafiza oaselor lungi și corticala oaselor scurte. Țesutul osos haversian este format din unități morfofuncționale numite *osteoane (osteon)* sau sisteme haversiene (fig. 6.7). Pe

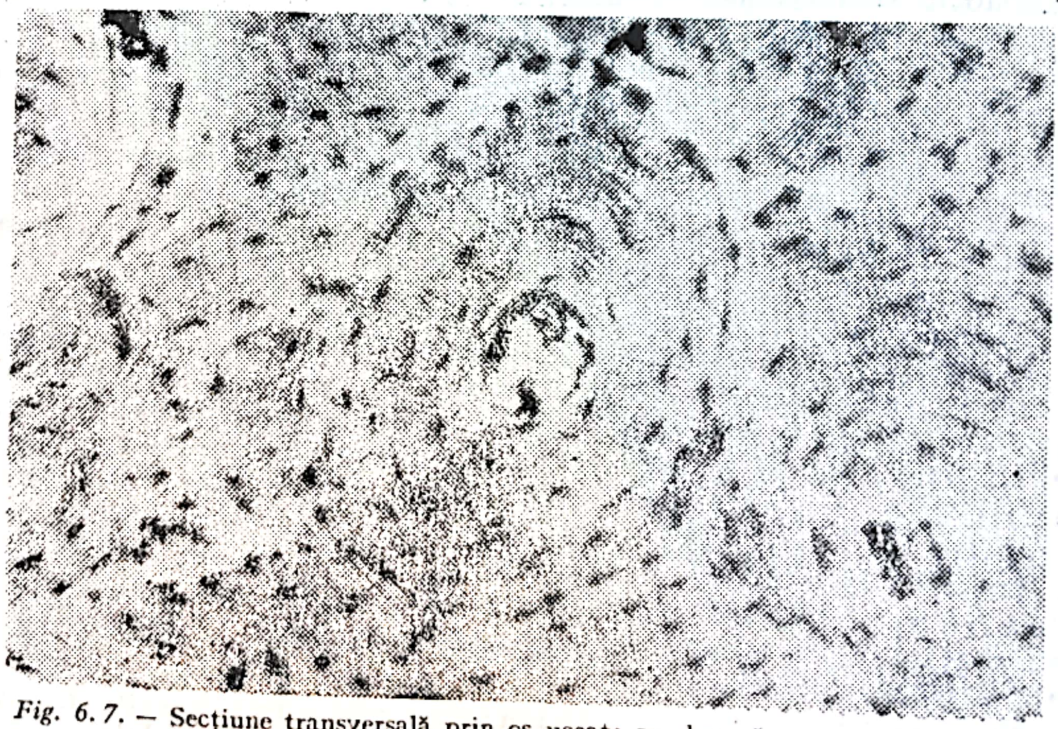


Fig. 6.7. — Secțiune transversală prin os uscat: se observă osteonul centrat de un canal Havers. În jurul lui sînt dispuse concentric lamele osoase în care se găsesc lacune (× 800).

Scanned with OKEN Scanner

secțiune transversală fiecare sistem apare centrat de un canal numit *canalul Havers*. Pe secțiune longitudinală se observă cum aceste canale străbat întreg osul de la un capăt la celălalt, au direcție paralelă între ele și paralelă cu axul lung al diafizei. Calibrul lor variază de la 20 la 100 micrometri. Din loc în loc canalele Havers sînt unite între ele prin canale oblice, canale Volkmann, stabilindu-se astfel o vastă rețea canaliculară în întreg osul compact. În interiorul canelelor Havers se găsesc, în funcție de diametrul lor, elemente con-

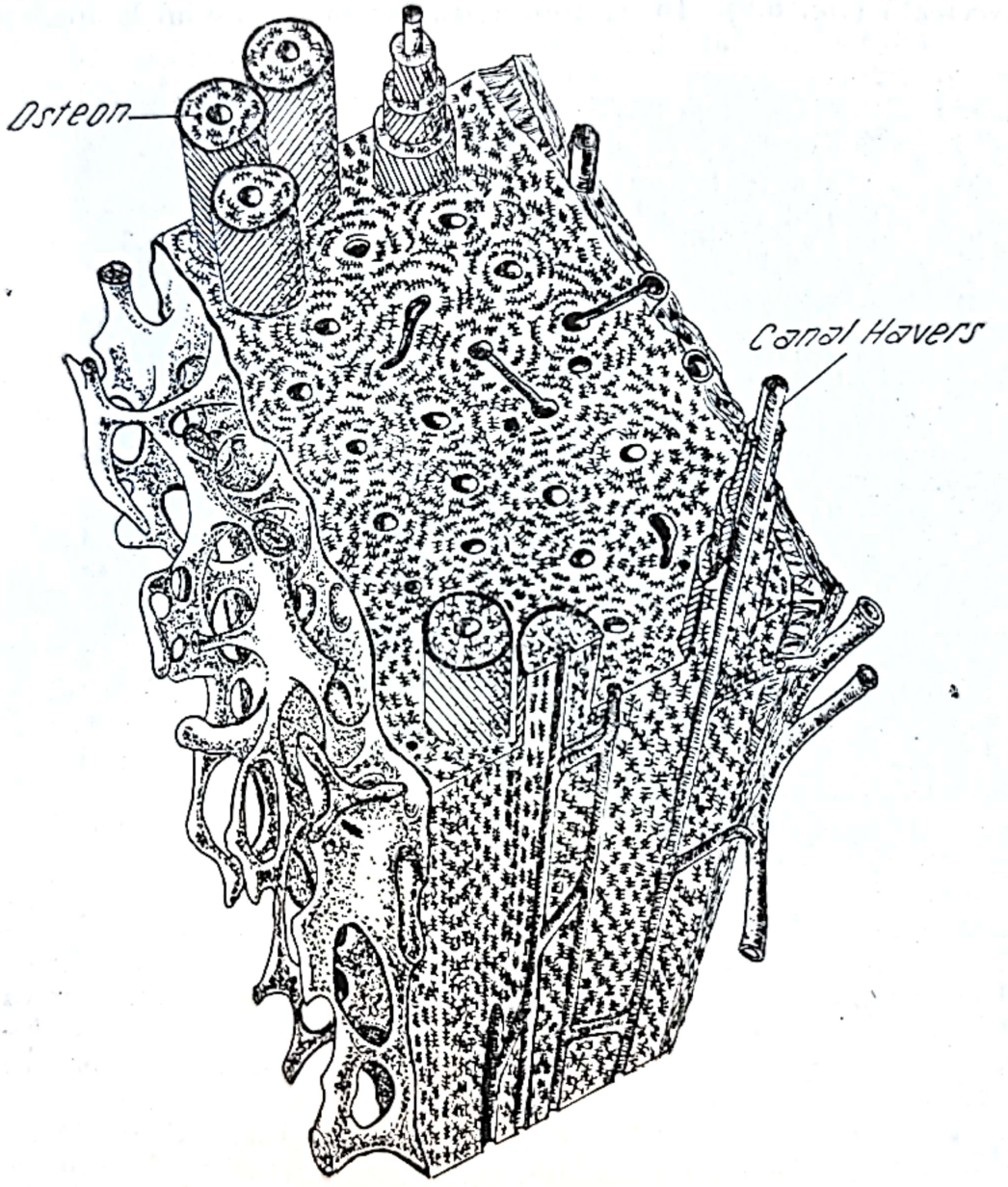


Fig. 6.8. — Schema organizării structurale tridimensionale a osului compact.

junctivo-vasculo-nervoase. Astfel, canalele mici conțin rare fibre de reticulină, rare celule conjunctive și uneori un capilar sanguin. Canalele de calibru mare conțin un țesut conjunctiv lax, bogat vascularizat printr-o arteriolă, o venulă și capilare (fig. 6.8).

Scanned with OKEN Scanner

În jurul fiecărui canal Havers se dispun concentric 8—15 *lamele osoase (lamella osteoni)*, fiecare avînd o grosime de aproximativ 12 micrometri. Privite la microscopul de polarizație ele apar în jurul fiecărui canal Havers într-o alternanță regulată de lamă întunecată și lamă clară. Acest fapt se datorește orientării fibrelor de colagen ce se găsesc în matricea lamelelor osoase. Fibrele sînt așezate paralel între ele în aceeași lamelă osoasă și au traiect helicoidal. Gradul de înclinare a helixului este diferit de la o lamelă la alta, astfel că în unele puncte, fibrele din lamelele adiacente se intersectează în unghi drept, ceea ce face ca ele să apară perpendiculare pe cele din lamela învecinată (fig. 6.9). În secțiunea transversală a osului la lumina

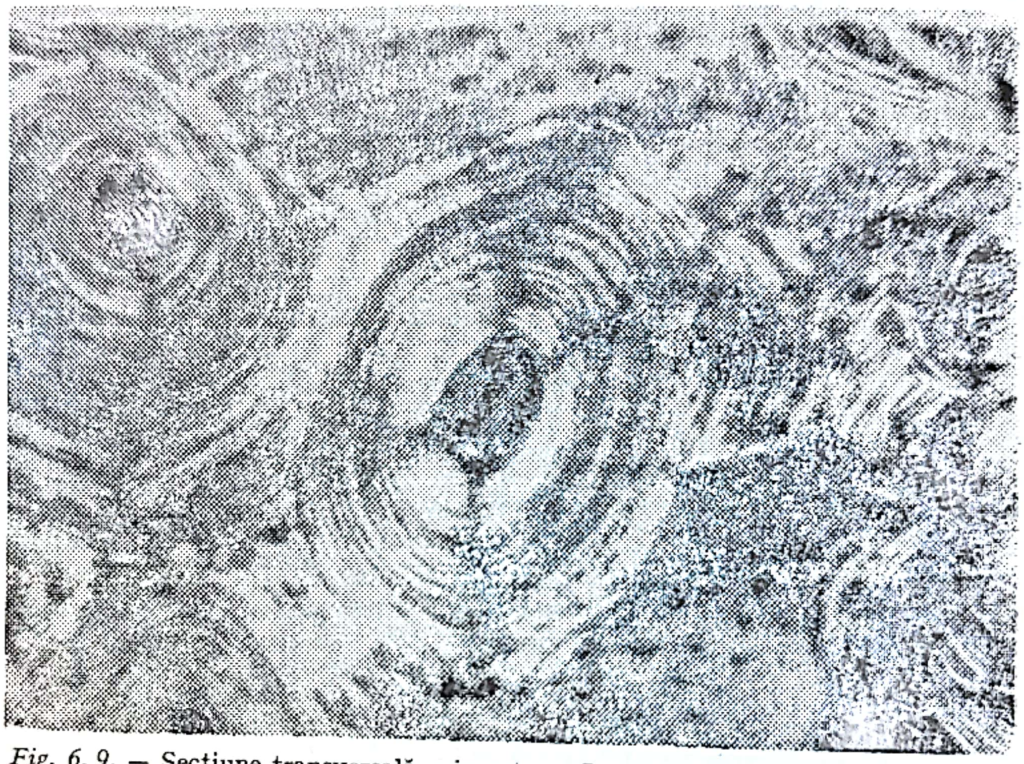


Fig. 6. 9. — Secțiune transversală prin osteon. Imagine la microscopul de polarizație cu nicolii încrucișați.

polarizată, lamelele clare au fibrele orientate circular în jurul canalului Havers și prezintă o marcată birefringență. În lamelele osoase întunecate, în aceeași secțiune, fibrele colagene dispuse paralel cu axul lung al canalului, apar ca granule sau puncte întunecate, rămînînd obscure la nicolii încrucișați. Fibrele colagene din lamele sînt incluse în matricea *preosoasă sau oseina*. În lamelele osoase ale osteoanelor sînt săpate cămăruțe sau *lacune osoase* (osteoplaste) de formă alungită — pînă la 20—40 micrometri și largi de 6—15 micrometri. De la fiecare lacună osoasă pleacă în toate direcțiile mici canalicule osoase prin care acestea se anastomozează între ele, trecînd și în canalicule osoase ale lacunelor din aceeași lamelă osoasă sau din lamelele învecinate. Canaliculele osoase ale lacunelor situate în lamela osoasă cea mai externă a osteonului se recurbează de obicei întorcîndu-se în lacuna de origine. O parte din ele stabilesc legături cu lacunele osteoanelor vecine. Canaliculele osoase ale lacunelor lamelei osoase interne din jurul canalului Havers se deschid în acesta. Se realizează astfel un al doilea sistem canalicular al osului

Scanned with OKEN Scanner

compact, adăugat celui format de canalele Havers, ambele necesare desfășurării metabolismului local osos. În lacune, sînt adăpostite celulele osoase adulte sau osteocitele.

Osteoanele sînt legate între ele prin sisteme osoase compacte *intermediare sau interstițiale*. Acestea sînt reprezentate prin fragmente de osteoane arcuate, necentrate de canal Havers. Ele reprezintă de fapt restul din primele osteoane formate în osul respectiv. Prin apariția ulterioară a noi osteoane, cele vechi, primare, se remaniază, din ele rămînînd numai mici segmente. Prezența lor în osul compact adult dă însă o mare rezistență și flexibilitate acestuia.

Sistemele haversiene intermediare sînt delimitate la exteriorul diafizei prin *sistemul circumferențial extern* și înspre cavitatea medulară centrală a diafizei, prin *sistemul circumferențial intern*.

Lamelele osoase din aceste sisteme au dispoziție circulară față de un ax ce trece prin canalul medular al osului și sînt paralele între ele; aceste zone nu au sisteme Havers.

În osul compact, există, în afara canalelor Havers, un alt tip de canale ce conțin țesut conjunctiv și vase sanguine, canalele Volkmann; ele au direcție oblică, iar traiectul lor unește două canale Havers învecinate. Vasele sanguine din canalele Volkmann se unesc cu cele din canalele Havers (fig. 6.10 și 6.11).

Fig. 6.10. — Secțiune longitudinală prin os compact uscat; se observă canalele Havers în lungimea lor și canalele oblice Volkmann, precum și țesutul osos lamelar cu lacunele osoase. Imagine la microscopul optic (× 250).

Canalul Volkmann nu este înconjurat de lamele osoase concentrice, ceea ce permite recunoașterea lui pe secțiunile de os.

Scanned with OKEN Scanner

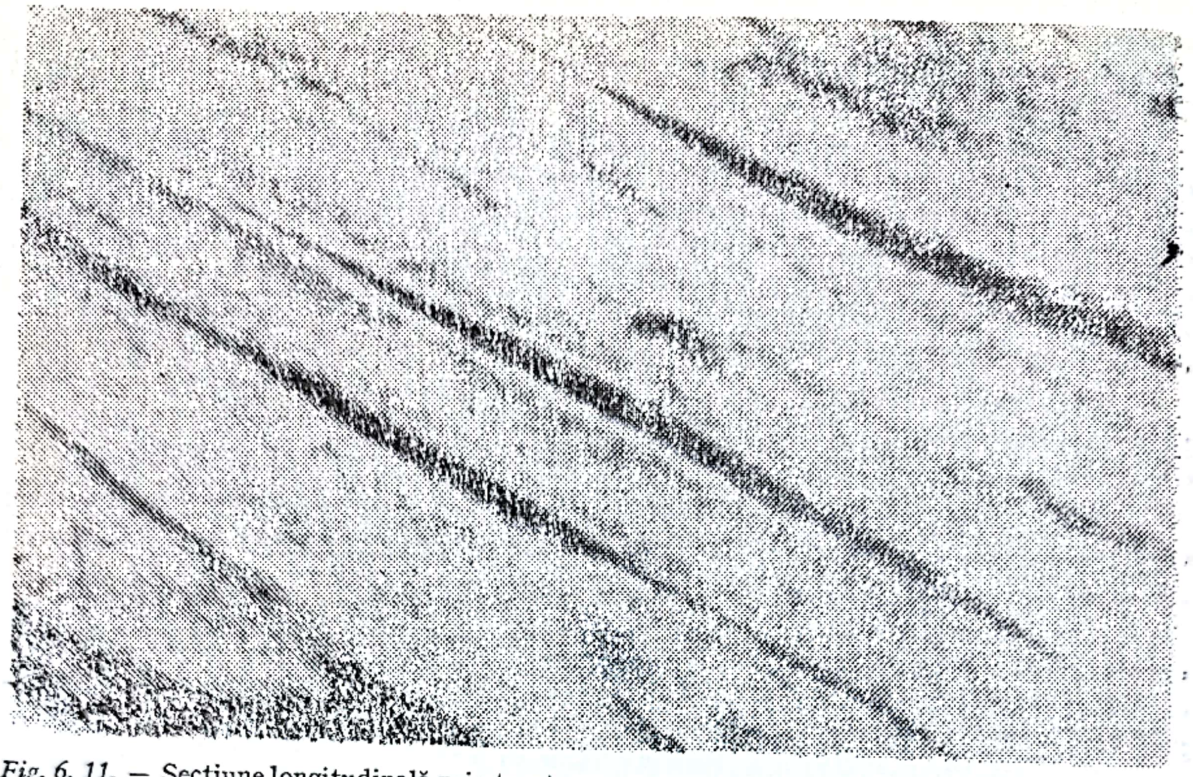


Fig. 6. 11. — Secțiune longitudinală prin țesut osos compact: se observă în negru canalele Havers. Imagine la microscopul de polarizație (× 250).

6.2.3.2. Țesutul osos spongios

Este alcătuit din pereți subțiri osoși, numiți trabecule, de forme și grosimi diferite. În general, orientarea lor răspunde forțelor ce se exercită asupra osului respectiv. Între trabecule se găsesc cămăruțe sau compartimente inegale ce conțin în interiorul lor măduvă osoasă. Lamelele osoase conțin lacune osoase și adăpostesc osteocite. Lamelele nu sînt centrate de un canal haversian. Țesutul osos spongios se găsește în epifiza oaselor lungi, în partea centrală a oaselor mici și a oaselor plate.

6.2.4. OSUL CA ORGAN

6.2.4.1. Tipuri de oase

Osul ca organ se prezintă sub formă de oase lungi, oase scurte și oase late. În oasele lungi diafiza este alcătuită din țesut osos compact, la unele din ele cu o mică zonă de țesut osos spongios în jurul canalului medular principal. La cele două capete ale diafizei se află epifizele formate, în principal, din țesut osos spongios, acoperit de un strat subțire de țesut osos compact. Oasele mici au în centrul lor nu nucleu de țesut spongios, care este înconjurat complet de țesut osos compact. Oasele late sînt alcătuite din două lame osoase, externă și internă, de țesut osos compact numite *tăblii osoase*. Între ele se află țesut osos spongios numit *diploe*. În centrul diafizei oaselor lungi, ca și în lacunele osoase neregulate ale osului spongios, se găsește măduvă osoasă în cantități diferite.

Scanned with OKEN Scanner

6.2.4.2. Periostul (Periosteum)

Periostul (*periosteum*) este foița conjunctivă care înconjură osul la periferie. Ea prezintă două zone: *o zonă internă* și o *zonă externă*.

Zona internă celulară conține un număr mare de celule conjunctive, numite celule osteogene sau osteoprogenitoare. În timpul formării osului, această zonă este activă, celulele osteogene transformîndu-se în osteoblaste. După încheierea osteogenezei stratul celular intern intră în repaus, celulele sale se turtesc și sînt foarte puțin active. În caz de fracturi însă ele se reactivează, se transformă din nou în osteoblaste, celule generatoare de os.

Zona externă a periostului este formată din țesut conjunctiv dens, bogat în fibre colagene și vase sanguine. O parte din fibrele colagene pătrund perpendicular în os, sub formă de fibre Sharpey.

6.2.4.3. Endostul (Endosteum)

Endostul (*endosteum*) este foița conjunctivă care căptușește cavitatea medulară a diafizei oaselor lungi. Este o foiță subțire în osul adult. Ea pare mai evidentă în cursul formării osului. Către țesutul osos foița este căptușită de un rînd de celule osteoprogenitoare, care pot da naștere osteoblastelor, în perioadele formării osului, cînd și grosimea endostului este mai pronunțată.

6.2.4.4. Măduva osoasă

Măduva osoasă se prezintă sub mai multe aspecte.

— *Măduva roșie osteogenă* este prezentă în cursul osteogenezei fiind formată dintr-o rețea de reticulină, numeroase celule formatoare de os (osteoblaste și osteoclaste) și vase sanguine.

— *Măduva roșie hematogenă* sau *hematoformatoare* sau *hematopoietică*, se găsește la adult în oasele late (stern), în corpurile vertebrelor (coloana dorsală). Ea formează în permanență elementele figurate ale sîngelui. În structura ei se găsește țesut conjunctiv reticular, în rețeaua căruia apar un număr mare de celule aparținînd seriei roșii eritrocitare, albe leucocitare și seriei megakariocitare. Pe lîngă acestea apar numeroase capilare sinusoide.

— *Măduva galbenă* ocupă de obicei cavitatea medulară a diafizei oaselor lungi. Rețeaua de reticulină cuprinde în ochiurile ei adipocite care dau culoarea galbenă. În caz de solicitare crescută, ca în anemii sau hemoragii, măduva galbenă se transformă temporar în măduvă roșie hematogenă.

— *Măduva cenușie fibrilară* este măduva oaselor bătrînilor. Conține în principal fibre conjunctive și puține celule, de aspect veziculos.

— *Măduva gelatinoasă* apare în cazuri patologice, după maladii cașectizante (tuberculoză, tumori).

6.2.4.5. Nutriția osului

Nutriția osului este asigurată de ramuri arteriale ce provin în cea mai mare parte din periost, de unde pătrund în canalele Havers și Volkmann. Ele se distribuie în tot țesutul osos prin capilare, din care sîngele va fi reco-

Scanned with OKEN Scanner

lectat apoi în venule ce urmează în sens invers traiectul arterelor. Fiecare os lung primește separat în diafiză și o arteră nutritivă primară, principală, ce ajunge prin canalul nutritiv la măduva osoasă a canalului medular central, unde se ramifică dînd ramuri distale și proximale.

Epifizele primesc sîngele prin arterele epifizare, care se distribuie prin capilare în spațiile anfractuoase cu măduvă ale osului spongios.

6.2.4.6. Inervația osului

Inervația osului este bine reprezentată în periost prin filete nervoase amielinice, dispuse în formă de rețea. Adeseori filetele nervoase se termină liber pe structurile foiței conjunctive periostice sau pot apărea încapsulate sub formă de receptori Vater-Pacini și Ruffini. În țesutul osos pot apărea filete nervoase ce întovărășesc vasele sanguine în canalele Havers și Volkmann.

În țesutul osos nervii sînt în majoritatea lor vasomotori și trofici, de orgine cerebro-spinală și simpatică.

Filete nervoase terminale amielinice se găsesc în măduva osoasă, pe celulele endoteliale, vasculare și pe celelalte tipuri de celule din componența ei.

6.2.5. OSTEOGENEZA (OSIFICAREA, FORMAREA OSULUI)

Procesul de formare a țesutului osos se realizează fie *intramembranos* pe țesut conjunctiv *(osificare desmală)*, fie pe *model cartilaginos (osificare encondrală)*, care, treptat, este distrus și înlocuit cu țesut osos. În ambele procese primul țesut osos care apare este țesutul osos imatur sau primar, cu viață scurtă; acesta este curînd înlocuit cu țesut osos definitiv, secundar sau lamelar. În timpul osteogenezei pot apărea împreună, în același os, zone de țesut osos imatur, zone de resorbție și zone de țesut osos lamelar. Există deci în permanență în os, procese active de sinteză și de resorbție care se mențin de altfel pe toată durata vieții individului. După încetarea procesului de osificare și constituire a osului, aceste procese se desfășoară la o rată foarte redusă.

Oricare ar fi modul de formare a osului, mecanismul biologic osteogenetic este asemănător; el presupune intervenția mai multor factori printre care:

— prezența celulelor osteogenice (osteoblaste) și osteoclazice (osteoclaste);

— prezența unei bogate vascularizații care să asigure viața celulelor osoase și să aducă materialul necesar osificării;

— formarea de către osteoblast a matricei preosoase (țesutul osteoid) care conține fibrele colagene și matricea extracelulară;

— modelarea și remodelarea osului nou format.

6.2.5.1. Osificarea intramembranoasă (Osteogenesis membranacea)

Osificarea intramembranoasă (*osteogenesis membranacea*) se realizează pe model conjunctiv. Ea este destinată a forma vasele cutiei craniene și unele oase ale feței (exemplu: maxilarul superior se formează din fuziunea

Scanned with OKEN Scanner

a două endomembrane, respectiv maxila, cu 4—6 puncte de osificare, și premaxila, cu un centru de osificare în partea anterioară a palatului. Osificarea intramembranoasă începe în foița conjunctivă mezenchimală, prin apariția unor *centre sau nuclee de osificare*. În jurul lor se concentrează celulele fibroblastice ce se vor transforma în osteoblaste. Ele vor depune matrice către centrul nucleului de osificare, corpul lor îndepărtîndu-se mereu, pe măsura lărgirii nucleului matriceal și mineralizării lui prin depunerea cristalelor de hidroxiapatită. Aceste insule sau nuclee mineralizate, lărgite, se numesc *spiculi* datorită formei lor. Spiculii vor forma, prin îngroșare și lungire, structuri osoase anastomozate, numite *trabecule sau travee osoase*. O parte din osteoblaste rămîn incluse în osul nou-format și se transformă în osteocite. Primele travee sau trabecule osoase, de mărimi și cu dispoziție diferită, se dispun de-a lungul fibrelor colagene din membrana conjunctivă. În spațiile dintre trabecule pătrund vase sanguine și celule conjunctive nediferențiate care vor da naștere celulelor măduvei osoase. Spiculii vor fuziona prin creștere, înlocuind țesutul conjunctiv pe care s-au dezvoltat. Peste primele trabecule osoase se vor depune noi lamele osoase de către mezenchimul înconjurător, care treptat, la periferia acestora, se transformă în periost. Aceste noi travee vor micșora spațiile dintre ele în așa fel încît treptat, osul cu caracter spongios la început, se va transforma în os compact. Oasele late ale cutiei craniene sînt formate în final dintr-o lamă spongioasă centrală numită diploe, acoperită pe ambele fețe de două lame osoase compacte numite tăblii osoase. La naștere, oasele craniului nu sînt complet unite. Între ele rămîne țesut conjunctiv încă neosificat care realizează *fontanelele*. Cu timpul, acestea se vor transforma în țesusul osos compact al tăbliilor osoase.

6.2.5.2. Osificarea intracartilaginoasă (encondrală) (Osteogenesis cartilaginea)

Osificarea encondrală se realizează pe model cartilaginos hialin. Prin acest tip de osificare se formează majoritatea oaselor scheletului care sînt precedate în viața intrauterină de modelele cartilaginoase respective. Osificarea encondrală este mai simplă în oasele mici (scurte) care nu au epifiză, dar este caracteristică și tipică oaselor lungi, alcătuite din diafiză și epifiză.

6.2.5.2.1. Osificarea encondrală embrionară și fetală

În oasele lungi, *primul centru (centrul primar)* de osificare apare în diafiză iar *centrele secundare* de osificare apar mai tîrziu, în epifize. Centrul primar de osificare este prezent în unele cartilaje și scheletul primitiv încă din a doua lună de dezvoltare intrauterină. Înainte de naștere, sînt prezente doar cîteva centre de osificare secundare, într-un număr redus de epifize. Majoritatea centrelor secundare, epifizare de osificare apar în copilărie și/sau în adolescență (fig. 6.12).

Dezvoltarea și creșterea modelului cartilaginos. Cartilajul hialin este învelit de pericondru avînd un strat intern condrogenic și un strat extern conjunctiv fibros. El derivă din mezenchimul embrionar și continuă să se dezvolte luînd forma viitorului os, prin creștere interstițială (prin diviziunea

Scanned with OKEN Scanner

condroblastelor) și apoziţională (prin depunerea de noi straturi de matrice la periferia modelului cartilaginos de către condroblastele stratului condrogenic al pericondrului).

Formarea osului periostal apare ca un stadiu mai avansat în formarea osului primar. Din stratul condrogenic activ, unele celule se diferenţiază în

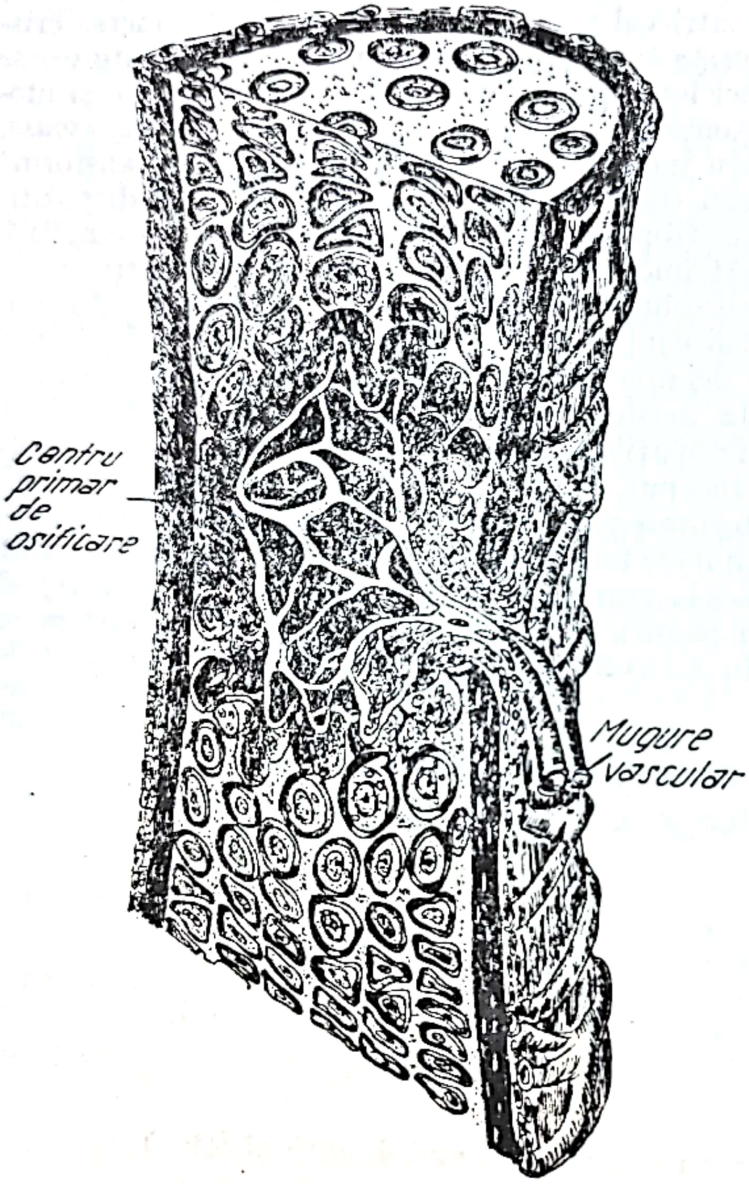


Fig. 6. 12. — Schema osificării encondrale în osul lung. Apariţia centrului primar de osificare în diafiză cu proliferarea mugurelui conjunctivo-vascular.

osteoblaste, care vor realiza stratul osteogenic la suprafaţa modelului cartilaginos. Acesta apare ca un cilindru subţire în jurul treimii mijlocii a modelului cartilaginos (al viitoarei diafize a osului lung), numit *guler osos periostic*.

Pericondrul se va numi din acest stadiu periost, stadiul ce urmează după depunerea primei lame osoase, iar lamelele nou-formate se vor numi os periostal sau subperiostal, realizat la început prin osificare intramembranoasă.

Formarea centrului primar de osificare. În acelaşi timp cu apariţia osului periostal, apare în mijlocul diafizei cartilaginoase centrul primar de osificare, locul unde se produc modificări ale celulelor cartilaginoase, care se hipertro-

Scanned with OKEN Scanner

fiază și apoi degenerează, deoarece lamelele osoase periferice ale gulerului periostal nou-format împiedică difuzarea substanțelor nutritive și a oxigenului în cartilaj. Condroblastele resorb matricea înconjurătoare, determinînd o lărgire a lacunelor matriceale, care, cu timpul, rămîn goale, acelulare. Pe matricea restantă se depun săruri de calciu, transformînd cartilajul hialin în cartilaj calcifiat.

Mugurele vasculo-conjunctiv periostal. Din periost, în același timp cu apariția proceselor degenerative cartilaginoase, din mijlocul diafizei, capilarele sanguine din dreptul zonei mijlocii a diafizei proliferează și pătrund în cartilajul degenerat împreună cu celule osteogene. Ele formează o unitate numită *mugure periostic*. Pe măsură ce vasele avansează, ele determină dispariția pereților subțiri calcifiați din cartilajul degenerat, lărgind mult lacunele și deschizîndu-le. Ajuns în centru, mugurele vasculo-conjunctiv proliferează rapid iar țesutul conjunctivo-vascular va umple toate spațiile libere lacunare și canaliculare ce s-au format în cartilaj. Celulele osteogene sosite odată cu capilarele sanguine, se vor diferenția în osteoblaste și vor începe depunerea de matrice preosoasă peste rămășițele de cartilaj calcifiat. Noul țesut osos format este țesut spongios incluzînd și cartilajul restant. Acesta apare roșu în colorația hematoxilină-eozină, fiind inclus în grosimea trabeculelor osoase nou-formate care se colorează în albastru-palid cu hematoxilină-eozină. Zona centrală axială diafizară suferă procese de resorbție care duc la formarea *canalului medular*, în care țesutul conjunctivo-vascular invadator va forma țesutul mieloid al *măduvei osoase primare*.

Dezvoltarea osoasă longitudinală a diafizei. La început, centrul diafizar este osos iar capetele diafizare rămîn cartilaginoase. Diafiza continuă să crească în lungime, prin creșterea interstițială a condroblastelor din cartilajul hialin ce se găsește de o parte și de alta a centrului primar de osificare. Totodată, diafiza crește în grosime prin apoziția de noi lamele osoase de către periostul ce înconjură modelul cartilaginos. Pe măsură ce osul crește în lungime, el se și osifică, datorită proliferării și invadării lui de către țesutul vasculo-conjunctiv al centrului primar de osificare, procesul continuîndu-se în mod similar cu cel din primul centru de osificare a diafizei. Expansiunea osificării primare este însoțită la periferia osului de expansiunea gulerului osos periostal, care crește în direcția epifizelor. Creșterea interstițială a cartilajului dă naștere în final, la ambele capete ale diafizei, celor două epifize, care, după ce au ajuns la grosimea cerută, încetează să se mai dezvolte, în timp ce diafizele își continuă creșterea longitudinală.

Formarea centrilor secundari (epifizari) de osificare. Centrii secundari de osificare apar de obicei cîte unul în fiecare epifiză, în special după naștere (fig. 6.13). În același os pot apărea simultan sau la intervale diferite. Cele mai multe oase lungi au două centre secundare epifizare de osificare. La puține oase lungi apare un singur centru secundar, la unul din capetele epifizare. Oasele mici nu au centru secundar de osificare, ele se dezvoltă în întregime din centrul primar diafizar de osificare.

Centrii secundari de osificare se formează, ca și centrul primar diafizar, dar direcția trabeculelor osoase nou-formate este radiară și nu longitudinală. Astfel condroblastele din mijlocul epifizei se hipertrofiază și se maturează, în timp ce matricea dintre ele se calcifică și se dezintegrează. Capilarele însoțite de celulele osteogene, provenite din cele diafizare, proliferează în cartilajul dezintegrat. Osteoblastele diferențiate vor depune matrice osoasă care

Scanned with OKEN Scanner

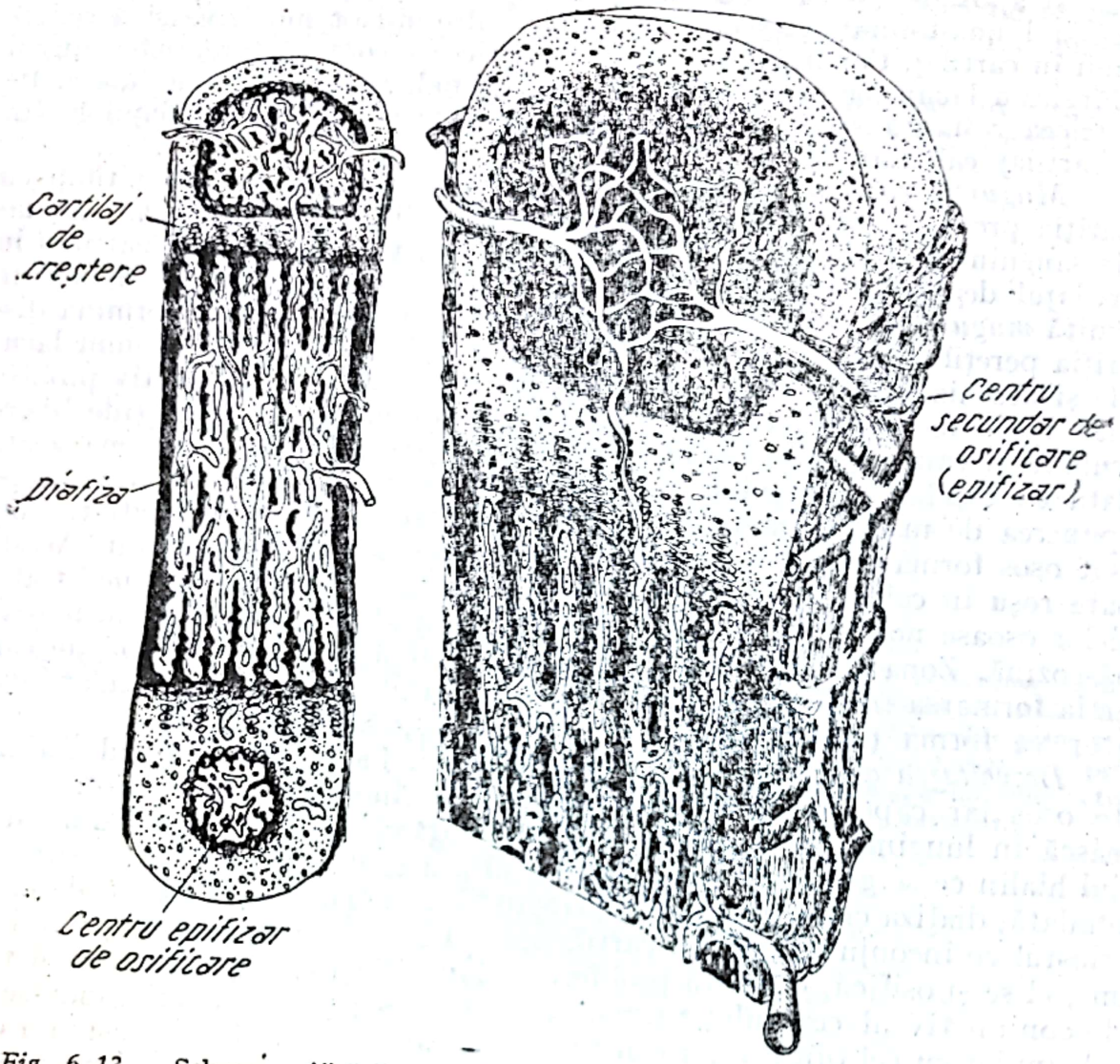


Fig. 6. 13. — Schema osificării encondrale în osul lung. Apariția centrului secundar (epifizar) de osificare.

înlocuiește cartilajul epifizar. Cartilajul hialin va mai persista sub formă de cartilaj articular, care va acoperi suprafața articulară a epifizelor și sub forma unui disc transversal, interpus între diafiză și epifiză. Acesta din urmă este numit *discul diafizo-epifizar* sau *cartilajul de creștere*, care asigură dezvoltarea în lungime a oaselor lungi pînă la vîrsta de 20 — 25 de ani, după care se osifică sudînd astfel epifizele la diafiză.

6.2.6. CREȘTEREA POST-NATALĂ A OASELOR LUNGI

După naștere, oasele lungi continuă să crească în lungime prin intermediul cartilajului diafizo-epifizar. La nivelul acestuia au loc creșteri interstițiale care alungesc diafiza ce se osifică pe măsură ce se formează. Marginea dinspre epifiză a cartilajului de creștere se îndepărtează treptat de diafiză, această

Scanned with OKEN Scanner

margine continuă formarea de cartilaj prin procese mitotice interstițiale (fig. 6.14). Formarea de os înspre diafiză este asemănătoare celei din centrul primar de osificare, dar etapele de transformare a cartilajului hialin în os sînt mai bine marcate, prin cinci zone transverse distincte, care, începînd de la partea epifizară către cea diafizară sînt următoarele:

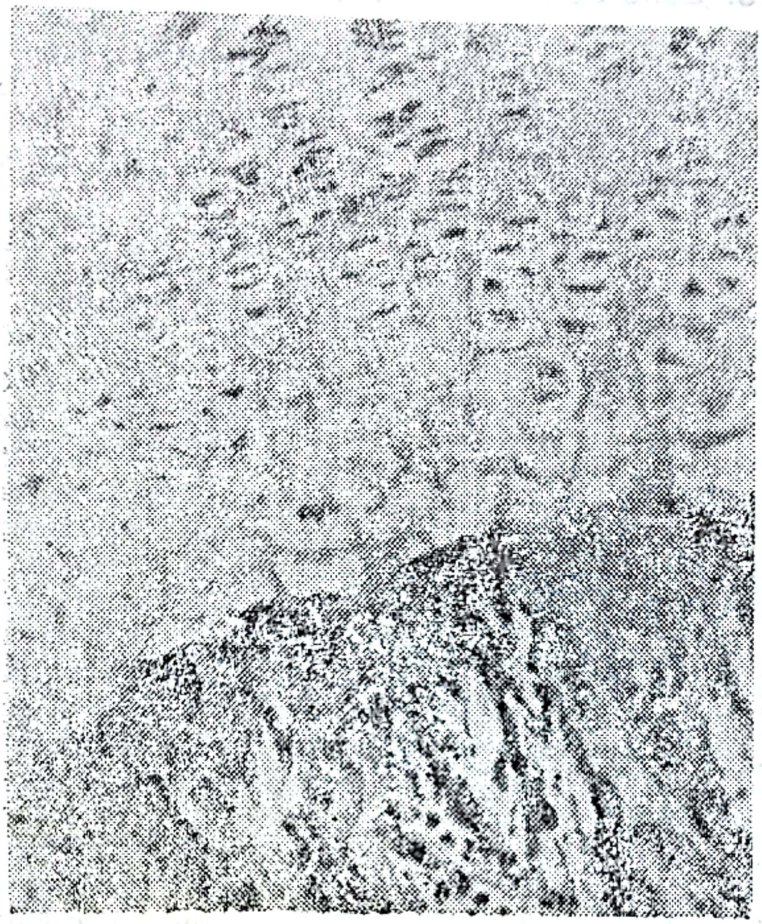


Fig. 6.14. — Osificarea encondrală a osului lung: cartilajul de creștere diafizo-epifizar (× 1 000).

6.2.6.1. Zona cartilajului de rezervă (în repaus)

Zona respectivă este formată din cartilaj hialin normal, fără modificări morfologice. Este socotită a fi în repaus deoarece condroblastele nu contribuie activ la creșterea osului. Rolul acestei zone este să lege restul cartilajului de creștere la epifize. Capilarele interpuse între această zonă și epifiză asigură hrana țesuturilor osoase și a cartilajului diafizo-epifizar.

6.2.6.2. Zona de proliferare (de multiplicare a cartilajului)

Zona de proliferare (de multiplicare a cartilajului) este o zonă predominant celulară și activă mitotic. Condroblastele se divid, celulele ce iau naștere se așază unele sub altele ca monedele într-un fișic, creînd șiruri sau coloane de celule paralele între ele și paralele cu axul lung al diafizei. Fiecare

Scanned with OKEN Scanner

coloană de condroblaste crește prin partea sa distală, între celulele aceluiași grup izogen axial aflindu-se puțină matrice cartilaginoasă. Aceasta rămîne însă mai bine reprezentată printre cordoanele condroblastice.

6.2.6.3. Zona de maturare (hipertrofiere) a cartilajului

În această zonă condroblastele rămîn aranjate în coloane dar mitozele la nivelul lor încetează iar celulele cresc în volum, se hipertrofiază, acumulează glicogen și lipide. Ele secretă fosfatazal alcalină, enzimă socotită a fi implicată direct în calcifierea matricei intracelulare. Lacunele cartilaginoase suferă și ele o lărgire accentuată.

6.2.6.4. Zona de calcifiere a cartilajului

Pe matricea cartilaginoasă dintre lacune se depozitează săruri insolubile de calciu, care împiedică principiile nutritive să ajungă la condrocite. În consecință, acestea dispar, lăsînd goale cămărușele în care se adăposteau. Pereții dintre lacunele aceleiași coloane se dizolvă și apar astfel canale osoase tubulare, paralele între ele, în care vor înainta vasele sanguine împreună cu țesutul conjunctiv osteogen. Zona calcifiată dintre șirurile de lacune apare intens bazofilă în colorația hematoxilină-eozină. De curînd în această zonă și începînd încă din partea profundă a zonei hipertrofiate, s-a identificat imunohistochimic o proteină extracelulară dimerică, calcafină, cu greutatea moleculară de 70 000, numită *condrocalcina,* care leagă puternic cristalele de hidroxiapatită. Ea se găsește în concentrație mare în epifize, în perioada de formare a centrilor secundari de osificare, dar este prezentă în cartilajele de creștere pe toată durata activității acestora.

În ultima vreme, au apărut păreri care susțin că toate condrocitele cartilajului de creștere, inclusiv cele adiacente regiunii de invazie vasculară, rămîn integre structural. Distrugerea condrocitelor în zona de calcifiere, descrisă și susținută de majoritatea cercetătorilor, s-ar datora procedurii chimice de evidențiere a celulelor. Înlocuind aceste tehnici clasice cu procedee moderne de *high pressure freezing, freezing substitution* și temperatură joasă de incluzie, se poate observa, la microscopul electronic, prezența condrocitelor intacte. Autorii respectivi sugerează că înșeși celulele cartilaginoase ar fi acelea care ar controla, cel puțin în parte, progresia calcifierii cartilajului și că distrugerea condroblastelor în zona de calcifiere nu este o precondiție obligatorie pentru invazia vasculo-conjunctivă.

6.2.6.5. Zona de osificare

Capilarele sanguine și celulele osteoprogenitoare derivate din periost, invadează lacunele zonei calcifiate. Celulele osteogene sau progenitoare se vor diferenția în osteoblaste și se vor așeza într-un strat discontinuu peste septurile calcifiate ale matricei cartilaginoase. Pe aceste septuri osteoblastele vor depunde matricea osoasă care se va mineraliza prin depunere de cristale de hidroxiapatită.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismul mineralizării matricei preosoase a fost explicat diferit de cercetători, dar în concluzie, se admite că atît celulele cît și matricea extracelulară au rol direct în inițierea procesului de depunere a sărurilor de calciu sau a formării așa-numitelor *nuclee* de mineralizare sau de osificare. Aceste nuclee diferite, după diferiții cercetători, pot fi inițiate de mitocondrii, fibre de colagen, structuri interfibrilare și/sau *veziculele matricei*. Majoritatea autorilor le acceptă pe acestea din urmă (veziculele matricei) ca fiind cele mai probabile nuclee de osificare, deoarece ele au fost observate în strînsă asociație cu faza minerală solidă a fosfatului de calciu. Ele apar la microscopul electronic sub formă de mici sfere delimitate de membrane, localizate în zona hipertrofică a cartilajului de creștere, în apropierea osteoblastelor.

Mecanismul apariției acestor nuclee de osificare și translocarea ionilor prin membrana lor nu sînt încă elucidate. Se pare că la locul apariției veziculelor, matricea conține o concentrație mare de sulf (provenind probabil din proteoglicani sau proteine specifice), care se află într-un raport anumit cu calciul. Peste Ca/S din aceste nuclee se adaugă apoi compuși de calciu și fosfor (Ca/P). Astfel în aceste nuclee are loc o modificare a structurii și chimiei matricei organice, care creează microzone de depunere a calciului și fosforului, pe agregate matriceale bogate în sulf.

6.2.6.6. Osificarea mixtă

Osificarea mixtă este mai puțin întîlnită în organism. Osul se formează, în cazul acesta, atît din membrana conjunctivă cît și din cartilajul hialin. Astfel de exemple sînt omoplatul, mandibula. Mandibula prezintă doi centri de osificare așezați de o parte și de alta a prelungirilor mandibulare; ei apar lateral de cartilajul Meckel, în timp ce în partea posterioară se află lateral de el. O parte a cartilajului Meckel suferă o osificare encondrală și contribuie la creșterea mandibulei, în timp ce altă parte a cartilajului degenerează.

6.2.7. REMODELAREA (REMANIEREA) OSULUI

Remodelarea osului are loc în permanență începînd cu perioada imediată de după formarea lui. Procesul de remodelare este mai accentuat în perioada de dezvoltare intrauterină și mai lent după constituirea osului adult. Situațiile în care are loc remodelarea osului pot fi sintetizate astfel: *a*) remodelarea din timpul vieții intrauterine avînd drept rezultat transformarea osului primar „fetal" în os adult, compact, cu sisteme haversiene sau spongios trabecular; *b*) remodelarea continuă a osului compact adult, cu crearea de noi sisteme haversiene și de lamele osoase interhaversiene (vestigii ale sistemelor haversiene mai vechi), a căror arhitectură este adaptată forțelor mecanice ce se exercită asupra osului; *c*) remodelarea osului spongios adult cu trabecule lamelare (epifiză, diploe), constînd în schimbarea diecției trabeculelor conform cu solicitările mecanice. Remodelarea rezultă din resorbția osului în anumite zone și depunerea de țesut osos nou în altele. Crearea de sisteme haversiene implică săparea unui tunel în osul compact, de către osteoclaste. Cînd tunelul s-a format, depunerea de os pe pereții săi începe aproape imediat, prin acți-

Scanned with OKEN Scanner

unea osteoblastelor. Cele două aspecte ale activității celulare sînt organizate ca o *„unitate de remodelare a osului"*. Există două părți distincte ale unității de remodelare: *un con de eroziune* (sau tunel de resorbție) și un *con de închidere*. Conul de eroziune constă din osteoclaste active, ce progresează prin liza osului, urmate de un capilar înconjurat de pericite. El conține de asemenea numeroase celule în mitoză care dau naștere la osteoblaste, la noi pericite și celule endoteliale. Osteoclastele sapă un tunel cu diametrul de aproximativ 200 μm. Acest canal stabilește diametrul viitorului sistem haversian. Conul de eroziune este doar o mică parte a unității osoase de remodelare; de aceea el poate fi observat cu o frecvență mai mică decît conul de închidere.

Tunelul de resorbție poate fi ușor deosebit de canalul haversian sau de canalul Volkmann datorită marginilor lui neregulate, erodate; prezenței osteoclastelor și nu a osteoblastelor de-a lungul marginilor lui.

După ce diametrul viitorului sistem haversian este stabilit, osteoblastele încep să depună matricea osoasă organică (osteoidul) pe pereții canalului, matricea osoasă ce se va mineraliza. Astfel, tunelul format de osteoclaste începe să se îngusteze datorită activității osteoblastelor. Pe măsură ce lamelele osoase sînt depuse de la periferie către centrul canalului, acestea se îngustează progresiv, pînă cînd ajunge de diametrul canalului Havers, ce rămîne în centrul osteonului astfel format.

6.2.7.1. Remodelarea internă

Remodelarea internă a osului este procesul de formare a noilor sisteme haversiene.

Osul compact adult, supus unei permanente reînnoiri, conține sisteme haversiene de diferite vîrste și, în funcție de vîrsta individului, un număr variabil de tunele de resorbție. Examinarea prin microradiografie a unei secțiuni șlefuite de os, arată că sistemele haversiene mai tinere sînt mai puțin mineralizate decît cele mai vechi. Ele se mineralizează progresiv, proces ce continuă, pînă la un anumit punct, chiar după ce sistemul haversian și-a constituit arhitectura.

Remodelarea internă a osului adult este un proces ce implică un echilibru între resorbția și depunerea osului. La bătrîni resorbția este adeseori mai intensă decît depunerea osului. Dacă acest dezechilibru se accentuează în favoarea resorbției, apare *osteoporoza*.

Oasele lungi se adaptează tot timpul la solicitările mecanice principale, remodelîndu-și structura internă. Orice schimbare în direcția solicitărilor mecanice provoacă un răspuns din partea osului, constînd în depunerea și resorbția adecvată de os compact sau schimbarea direcției trabeculelor osoase din osul spongios (fig. 6.15). De exemplu, la extremitatea proximală a femurului, micile aglomerări sau coloane de trabecule ale osului spongios al epifizei capătă direcția dictată de necesitatea adaptării la principalele solicitări mecanice de tipul compresiei, presiunii, îndoirii, torsiunii, datorate susținerii greutății corpului. Acest fenomen creează trabeculelor un desen arhitectural observabil pe o secțiune longitudinală, absolut caracteristic fiecărui individ.

Scanned with OKEN Scanner

Este cunoscut faptul că, atunci cînd un membru nu este folosit din diverse motive, nemaifiind supus forțelor mecanice obișnuite, se declanșează un proces de remodelare, ce se poate manifesta printr-o resorbție excesivă a osului, cu osteoporoză consecutivă, fenomen degenerativ cunoscut sub numele de „atrofie de repaus sau de nefolosire".

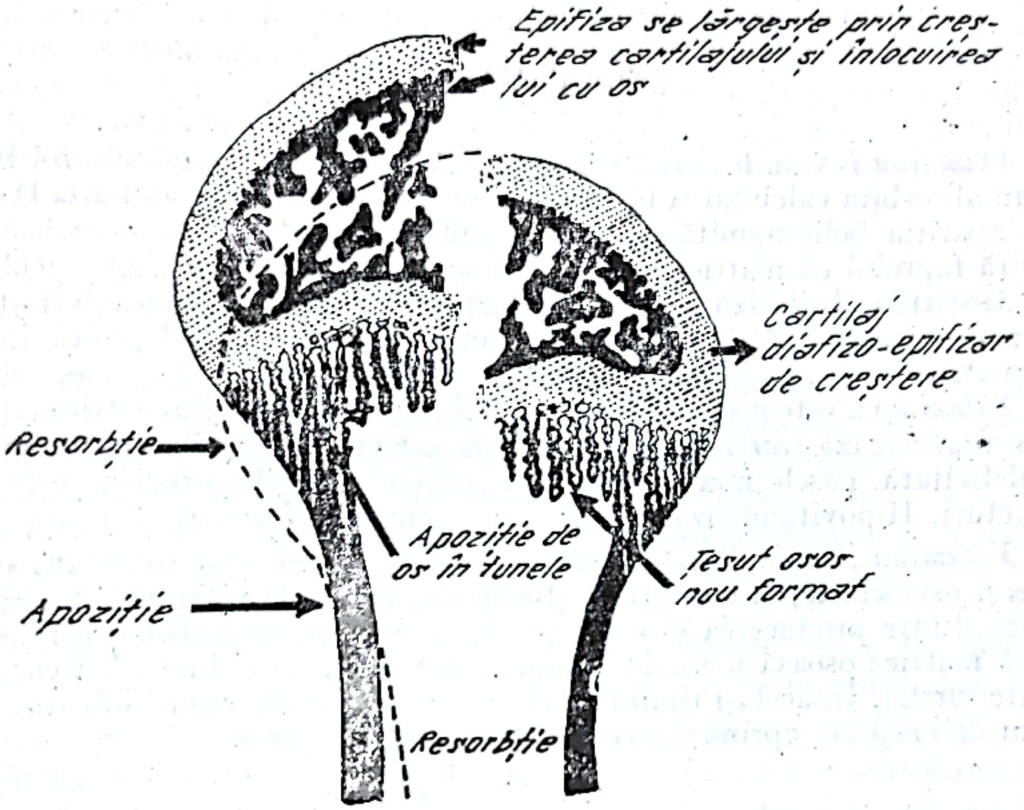


Fig. 6. 15. — Schema remodelării osului adult prin procese de resorbție și apoziție.

6.2.7.2. Remodelarea externă

Remodelarea externă a oaselor are ca rezultat păstrarea formei exterioare caracteristice fiecărui os, în timpul procesului de creștere a osului în lungime (în cazul oaselor lungi) sau în suprafață (în cazul oaselor late). Ea constă în resorbția parțială a osului în anumite regiuni și depunerea lui simultană în altele.

De exemplu, oasele craniului cresc mai ales prin depunerea de os pe suprafața externă și la nivelul suturilor, concomitent cu resorbția osului pe fața internă. Fiind un țesut plastic, osul se adaptează creșterii creierului și formează un craniu de proporții adecvate. Craniul poate fi mic atunci cînd creierul nu se dezvoltă complet sau mai mare decît normalul în hidrocefalie, boală caracterizată prin acumularea exagerată de lichid cefalorahidian în ventriculii cerebrali mult dilatați.

Oasele lungi, ca de exemplu femurul, își păstrează forma caracteristică, în timp ce cresc în lungime, prin depunerea și resorbția concomitentă a osului în regiuni adecvate.

Scanned with OKEN Scanner

6.2.8. FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ METABOLISMUL OSULUI ȘI PROCESUL DE OSTEOGENEZĂ

Țesutul osos este foarte sensibil la prezența sau absența unor factori nutriționali, în special vitamine sau hormoni.

6.2.8.1. Vitaminele

Vitamina D este necesară formării osului, deoarece joacă un rol important în absorbția calciului și fosforului din intestin. Hipovitaminoza D determină apariția bolii numită *rahitism*, însoțită de deformații ale scheletului, datorită faptului că matricea osoasă nu se calcifiază normal, iar spiculii formați de cartilajul diafizo-epifizar sînt distorsionați sub acțiunea activităților musculare și a greutății corpului. În consecință oasele se dezvoltă încet și deformat.

Vitamina C este necesară formării fibrelor de colagen din matricea osoasă. Lipsa ei generează *scorbutul*, boală în care activitatea cartilajului de creștere este deficitară, oasele nou-formate sînt subțiri și fragile, predispuse frecvent la fracturi. Hipovitaminaza C întîrzie repararea fracturilor.

Vitamina A este direct legată de activitatea celulelor osteogene (osteoblaste și osteoclaste) și a relațiilor dintre ele. Lipsa de vitamină A afectează balanța dintre producerea și resorbția de țesut osos. Osteoblastele nu sintetizează matrice osoasă normală și individul nu ajunge la înălțimea corespunzătoare vîrstei. În același timp hipovitaminoza A accelerează osificarea cartilajului de creștere, oprind dezvoltarea osului în lungime.

6.2.8.2. Hormonii

Concentrația calciului circulant este reglată în principal de doi hormoni, și anume: hormonul *paratiroidian* și *calcitonina*.

Hormonul paratiroidian, secretat de glandele paratiroide, crește nivelul calciului în sînge, prin stimularea funcției osteoclastelor care măresc, prin resorbție, eliminarea calciului din os și îl trec în plasma sanguină. Excesul de parathormon determină osteita fibroasă chistică.

Calcitonina, secretată de celulele C ale tiroidei, are acțiune antagonistă parathormonului; în consecință, scade concentrația calciului circulant prin stimularea funcției osteoblastelor. Celulele vor depune matrice osoasă care atrage și depune în ea sărurile de calciu sustrăgîndu-le plasmei sanguine. Calcitonina este mai activă la tineri, la care joacă un rol în dezvoltarea scheletului. Se presupune de asemenea că protejează oasele femeii de pierderea mare de calciu din timpul sarcinii sau alăptării. În aceste situații, secreția de calcitonină este crescută în organism. Calcitonina este folosită și în tratamentul bolii Paget, în hipercalcemia severă, în tratamentul osteoporozei.

Hormonul somatotrop (somatotropina), secretat de adenohipofiză, ajută creșterea oaselor în lungime, acționînd prin somatomedină asupra cartilajului diafizo-epifizar de creștere, la nivelul căruia stimulează proliferarea, secreția și

Scanned with OKEN Scanner

maturarea condrocitelor. Excesul de somatotropină pînă la vîrsta de 25 de ani biciuiește creșterea în lungime a oaselor determinînd *gigantismul*, iar hiposecreția de hormoni — *nanismul* (dwarfismul). După osificarea cartilajului diafizo-epifizar, excesul de somatotropină realizează *acromegalia*, boală în care oasele feței, și în special oasele lungi, se îngroașă foarte mult, deoarece nu mai pot crește în lungime.

Hormonii sexuali masculini (androgeni) și *feminini* (estrogeni) au în general efect stimulator asupra creșterii oaselor, determinînd momentul apariției centrilor de osificare. Hiposecreția lor întîrzie osificarea cartilajului de creștere, ceea ce duce la dezvoltarea exagerată în lungime a osului și deci a individului. Excesul de hormoni prin maturitate precoce, tumori, determină osificarea precoce a cartilajului de creștere.

6.2.8.3. Tulburări de sinteză și de mineralizare a matricei

Hiperosteoidoza, sau excesul de osteoid (deci os hipomineralizat), poate apărea în osteomalacie, boală cu deficiență de mineralizare, sau poate apărea în mineralizări normale cu depunere crescută de matrice preosoasă.

Osteoscleroza, sau prezența de cantități crescute de os, apare fie prin accelerarea formării de os, fie prin descreșterea resobției scheletale. Este însoțită de remodelări osoase alterate, anormale. Se constantă în hipoparatiroidism sau la indivizii cu metastaze tumorale.

Osteoporoza este caracterizată prin scăderea masei osoase, cu păstrarea raportului mineral/matrice. Se observă frecvent la bătrîni, fiind considerată o osteopatie senilă ce duce frecvent la fracturi, în special la partea distală a radiului, la coloana toracică inferioară și lombară, la regiunea intertrohanteriană a femurului. Cavitatea medulară a oaselor se lărgește datorită resobției circumferinței periostice și endostice, iar refacerile de os prin apoziție periostică sînt slabe.

Boala Paget (*osteoitis deformans*) se traduce prin accelerarea remodelării osoase datorită osteoclastelor și a resorbției osoase crescute.

Bolile metabolice ale osului afectează în general întreaga structură osoasă avînd drept consecință alterări ale remodelării osoase, ca în hiperparatiroidism, rahitism, osteodistrofia renală etc.

Osteita fibroasă chistică. În această boală sînt activate foart multe celule osoase (osteoblaste și osteoclaste); acestea determină un *turnover* scheletal rapid, cu sinteză dezorganizată a matricei, remodelare osoasă rapidă și creșterea raportului suprafeței la volum. Osul capătă aspect spongios și prezintă multe chisturi osoase. Osteita fibroasă este caracteristică excesului de hormon paratiroidian, dar apare și în hipertiroidism sau în boala Paget.

Boli congenitale (*osteogenesis imperfecta*) se pot prezenta cu fracturi la naștere, cu tulburări de creștere și modelare a oaselor. *Osteopetrosis* se observă radiologic prin apariția dens-opacă a scheletului, fără deosebiri între cortexul osos și trabeculele osoase.

Scanned with OKEN Scanner

6.2.9. REPARAREA FRACTURILOR

În fractura osoasă survin o serie de evenimente locale, care conduc în final la sudarea capetelor osoase prin formarea de țesut osos nou — prin osificare complexă intramembranară (fig. 6.16).

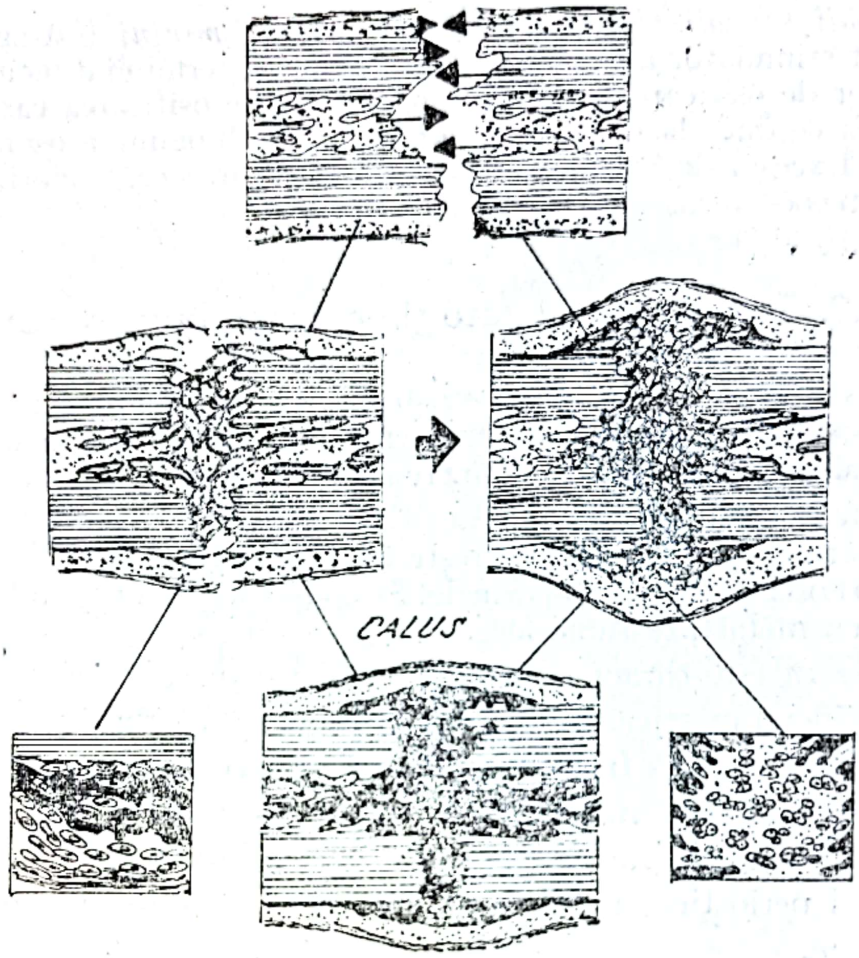


Fig. 6. 16. — Schema etapelor de formare a calusului osos după fracturi.

1. Imediat după fracturi, datorită faptului că odată cu ruperea osului au suferit rupturi și vasele sanguine, survine o hemoragie locală, urmată de realizarea unui coagul sanguin. Totodată, are loc și distrugerea capetelor osoase fracturate, cu pierderea de matrice și celule osoase. Acestea sînt îndepărtate treptat prin acțiunea macrofagelor.

2. Periostul și endostul se hipertrofiază și devin active în special prin stratul intern, osteogen, din care celulele, împreună cu capilarele sanguine, pătrund în coagulul sanguin intrafractural pe care-l organizează în țesut de granulație. Rezultă astfel un *procalus* sau *calus temporar* care unește capetele osoase. Celulele osteogene ale periostului și endostului se divid și vor forma un strat gros, interpus între os și stratul extern al periostului. Celulele cele mai profunde din acest strat osteogen, apropiat de capetele osoase fracturate, se diferențiază în osteoblaste care vor depune, la periferia fracturii cît și înspre centrul fracturii, matrice ce se mineralizează și realizează trabecule osoase. Celulele osteogene aflate în partea superficială, progenitoare ale stratului intern periostic, departe de os, se divid rapid, proliferînd mai repede decît vasele.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultă o zonă nevasculară în care celulele osteogene se diferențiază în condroblaste, care vor depune în jurul lor matrice, formînd cartilaj hialin. În zona osteogenă a fiecărui capăt osos se formează trei straturi distincte: unul intern lîngă os, reprezentat prin trabecule osoase, unul mijlociu reprezentat prin cartilaj și unul extern reprezentat de celule osteoprogenitoare în diviziune și diferențiere. Prin creștere, cele trei straturi ale fiecărui fragment osos se îngroașă și ajung să fuzioneze, legînd strîns între ele cele două capete osoase ale fracturii. Cartilajul format este temporar, el fiind înlocuit treptat cu țesut osos; se realizează astfel *calusul osos definitiv*. La început calusul este format din țesut osos spongios, care se va transforma în țesut osos compact ce va suda și va reface complet integritatea osului fracturat.

Remanierea calusului primar cu calus osos definitiv (formare de os compact, lamelar) este lentă și completă după 10—12 luni, interval după care structura originală a osului s-a refăcut. Uneori, cînd fragmentele fracturate nu sînt bine imobilizate, se formează între extremitățile osoase un calus cartilaginos ; osificarea nu are loc în acest caz, la locul fracturii formîndu-se o pseudartroză.

6.2.10. TRANSPLANTUL OSOS

Transplantul osos se efectuează în unele fracturi unde extremitățile osoase nu se sudează, în caz de distrugeri substanțiale de os, după accidente sau boli, pentru unirea a două oase separate printr-o articulație bolnavă etc. Grefa osoasă spongioasă sau compactă poate fi *autologă*, cînd se transplantează os de la același individ, sau *heterologă*, cînd osul transplantat provine de la un alt individ.

Transplantul osos trebuie astfel pus încît extremitățile sale să fie bine extinse în osul viu activ. Transplantul este invadat de celule osteogene și capilare sanguine, din periost, care vor forma trabecule osoase noi, ce se depozitează pe țesutul osos grefat. După ce transplantul s-a unit cu osul-gazdă, el este resorbit încet și înlocuit cu țesutul osos nou ce se formează. Resorbția se face la suprafața sa externă, dar într-un grad mai redus, și la suprafața internă a canalelor haversiene.

De multe ori în osul nou-format rămîn incluse zone de os transplantat. Totala lui înlocuire se poate realiza într-un timp mai îndelungat. Dacă transplantul osos are la periferie și fragmente de periost, formarea noului os decurge mult mai repede.

6.2.11. ARTICULAȚIILE OSOASE

Articulațiile osoase (*articulationes*) reprezintă ansamblul elementelor prin care oasele sînt ținute apropiate unele de celelalte. Articulațiile se împart în:

— *diartroze* sau articulații mobile;

— *sinartroze* sau articulații semimobile sau imobile.

Din acestea fac parte: sinostozele, sincondrozele și sindesmozele.

Scanned with OKEN Scanner

6.2.11.1. Diartrozele

Diartrozele sînt alcătuite din capetele articulare osoase, separate între ele printr-un spațiu numit *cavitatea articulară*. Capetele articulare sînt acoperite de un țesut fibrocartilaginos sau *cartilaj articular* (fig. 6.17). Uneori, în unele articulații în care capetele osoase nu realizează o joncțiune perfectă,

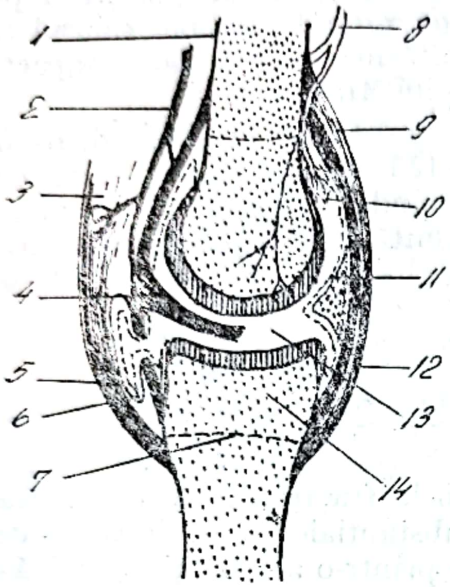


Fig. 6. 17. — Schema organizării unei articulații mobile (diartroză):
1 — periost; *2* — nerv; *3* — mușchi; *4* — menisc; *5* — tendon; *6* — perete bursal; *7* — linie epifizară; *8* — arteră ; *9* — ligamente; *10* — franj sinovial; *11* — membrană sinovială; *12* — capsulă fibroasă; *13* — cavitate articulară; *14* — cartilaj articular.

în cavitatea articulară se interpune între ele o lamă fibrocartilaginoasă care poartă denumirea de *menisc sau disc articular*. Întreaga articulație este învelită la exterior de o *capsulă articulară*, care poate prezenta în partea externă *ligamente* de întărire. Fața internă, articulară, a capsulei articulare este dublată de o foiță conjunctivo-vasculară numită *sinoviala*. În interiorul articulației se găsește *lichidul sinovial*.

6.2.11.1.1. Structura histologică a elementelor componente ale unei articulații mobile

a) Capetele osoase articulare sînt de obicei formate din țesut osos spongios cu trabecule osoase orientate în direcția forțelor de presiune. Ele delimitează spații largi, pline cu măduvă roșie, care uneori se poate activa devenind hematoformatoare. Către bătrînețe, trabeculele osoase se îngroașă, spațiile intrabeculare se micșorează foarte mult, măduva osoasă se reduce. Țesutul osos spongios este acoperit la periferie de o corticală osoasă compactă și foarte subțire.

b) Cartilajul articular (*cartilago articularis*), format din cartilajul hialin, acoperă suprafața articulară a oaselor respective. Grosimea sa variază de la o articulație la alta, în raport și cu forțele de presiune ce se exercită asupra cartilajului. Celulele cartilaginoase sînt mai numeroase în zona paraosoasă (învecinată capetelor osoase). Grupele izogene se răresc mult către fața articulară, unele dintre aceste celule capătă chiar aspect de fibroblaste. Se face

Scanned with OKEN Scanner

o trecere progresivă dinspre os către zona superficială, de la cartilajul hialin către țesutul conjunctiv fibros dens. Fibrele conjunctive sînt reprezentate în special prin fibre groase de colagen, grupate în benzi sau mănunchiuri. Acestea au direcții diferite de la suprafață spre profunzime. Sînt dispuse paralel cu suprafața osoasă articulară în zona superficială a cartilajului articular, unde sînt și mai dense, oblic în partea mijlocie a acesteia și perpendicular pe os în stratul profund. Acestea din urmă pătrund ca fibre Sharpey, în os, sudînd strîns cartilajul articular de os. Printre benzile de fibre colagene se pot întîlni rare fibre elastice, care asigură un grad de flexibilitate cartilajului. Cartilajul articular este lipsit de vase și de nervi. El se hrănește prin difuziune din lichidul sinovial articular.

c) Discul sau meniscul intraarticular este un fibrocartilaj ce prezintă zone de țesut conjunctiv, dens, fibrilar și celular, cu zone mici de cartilaj hialin. Meniscul articular este avascular și lipsit de nervi. El se hrănește prin difuziune din lichidul sinovial care-l scaldă. În caz de îndepărtate a meniscului cartilaginos, el poate fi regenerat de către capsula articulară.

d) *Capsula articulară* (*capsula articularis*) înconjură articulația ca un manșon continuîndu-se cu periostul osos. Ea este formată din două straturi — unul extern și altul intern.

Stratul extern sau stratul fibros este alcătuit din țesut conjunctiv fibros dens, care conține numeroase fibre colagene groase, dispuse în toate direcțiile, dar orientate adesea în raport cu forțele ce se exercită asupra articulației. Datorită numărului mare de fibre de colagen capsula este inextensibilă și asigură stabilitatea articulației. Unele fibre colagene pătrund în os, sub formă de fibre Sharpey. Matricea interfibrilară este relativ abundentă, în special către periferia capsulei articulare, iar celulele conjunctive de tip fibroblastic sînt relativ frecvente. Către zona osoasă de inserție, ele pot lua aspect de condroblaste. În unele puncte ale capsulei, printre benzile de fibre colagene pot apărea celule adipoase. Capsula articulară este întărită în partea sa externă prin concentrări de fibre colagene în așa-numitele *ligamente articulare* ce merg de la un capăt osos la altul.

Stratul intern al capsulei articulare este reprezentat de o foiță conjunctivă subțire, numită *sinoviala*. Ea căptușește numai fața internă a capsulei articulare, nu și fața cartilajelor articulare. Sinoviala este formată dintr-un țesut conjunctiv mai puțin dens, datorită prezenței unui număr mai redus de fibre conjunctive. Pe lîngă fibrele colagene, se găsesc un număr variabil de fibre elastice, precum și celule fibroblastice și adipoase (fig. 6.18). Sinoviala trimite înspre cavitatea articulară prelungiri sau franjuri numiți *vili sinoviali*. Aceștia prezintă un ax conjunctiv bogat în artere și capilare. Membrana sinovială este acoperită înspre cavitatea articulară de un rînd de celule cuboidale, aranjate ca într-un epiteliu simplu. La presiune mare ele pot deveni turtite. Ele derivă din celulele mezenchimale.

Celulele sinoviale, sinoblastele sau sinovialoblastele de suprafață (mezoteliul) sînt de mai multe tipuri: unele se aseamănă cu macrofagele și sînt numite *celule M*, caracterizate prin prezența în citoplasmă a unui complex Golgi, dezvoltat, lizozomi numeroși și un slab RER. Un alt tip de celulă sinovială este reprezentat prin *celulele F* care apar mai dense la fluxul de electroni și prezintă un RER foarte dezvoltat. Celulele F sintetizează proteine și glicozaminoglicani, în special acid hialuronic, care sînt secretați în lichidul sinovial. Sub mezoteliu nu există membrană bazală care să separe celulele sinoviale de țesu-

Scanned with OKEN Scanner

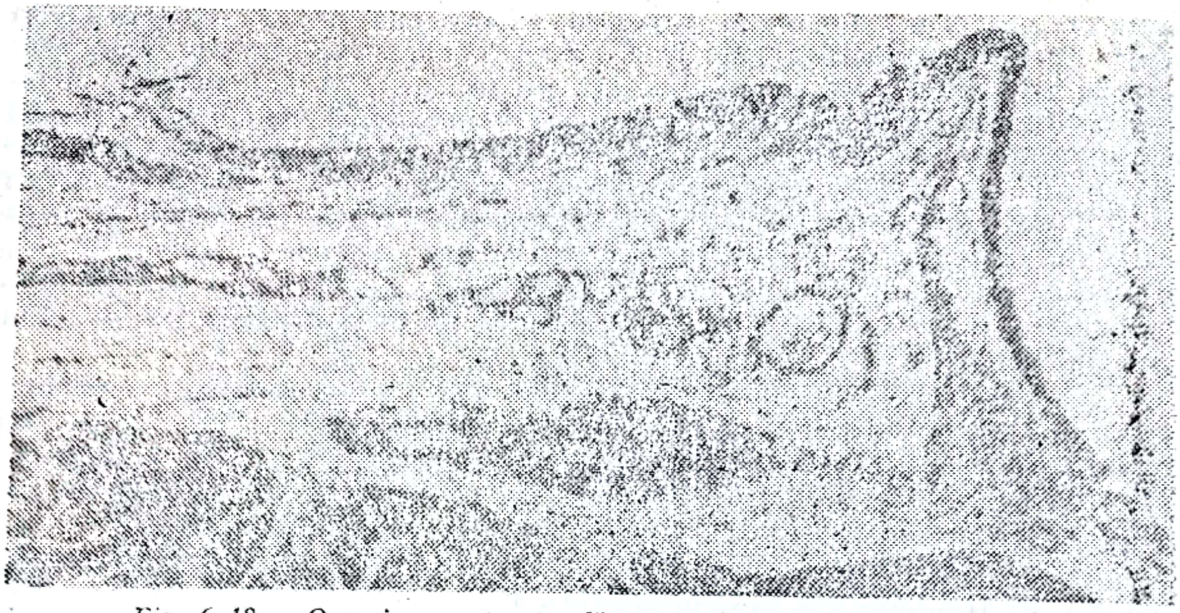


Fig. 6. 18. — Organizarea structurală a membranei sinoviale (× 725).

Fig. 6. 19. — Organizarea structurală a sinovialei: sinovioblaste și țesut conjunctivo-vascular (× 1 600).

tul conjunctiv subiacent, nici joncțiuni strînse intercelulare. Celulele sinoviale asigură schimburile dintre plasma sanguină din numeroasele capilare ale țesutului conjunctiv subiacent și lichidul sinovial din cavitatea articulară (fig. 6.19).

Funcțiile membranei sinoviale sînt de a regla pătrunderea materiilor nutritive în lichidul sinovial și de a împiedica intrarea în acest lichid a serum-proteinelor. Capilarele sanguine și limfatice asigură principiile moleculare de bază ale lichidului articular și totodată calea de drenaj pentru produșii nefolositori rezultați. Sinoblastele produc proteine și glicozaminoglicani, în special acid hialuronic pentru lichidul articular. Sinoblastele M din sinovială îndepărtează, prin activitatea lor fagocitară, detritusurile celulare din cavitatea articulară.

Scanned with OKEN Scanner

e) Lichidul sinovial scaldă suprafețele articulare; în mod normal este limpede, incolor sau galben-palid. El este în cea mai mare parte un dializat al plasmei sanguine. Schimburile de ioni și gaze între sînge și lichidul tisular se fac ușor, deoarece singura barieră dintre ele este numai membrana celulei endoteliale a capilarului. Astfel în lichidul sinovial ionii de clor, fosfat și bicarbonat se găsesc în concentrații aproximativ egale în cele două fluide, iar ionii de sodiu, potasiu, calciu și magneziu—în concentrație ușor mai scăzută. pH-ul normal al lichidului sinovial este 7,768; în osteoartroză scade ușor la 7,549. Și neelectroliții se găsesc în concentrații egale în sînge și în lichidul sinovial, cu excepția glucozei, care este mai scăzută (66 mg/100 ml față de 100 mg/100 ml de plasmă). Raportul globulinelor este de 3:1 în lichidul sinovial față de 1:1 în serul sanguin, reflectînd astfel proprietatea membranei sinoviale de a fi permeabilă pentru moleculele proteice mici. Lichidul sinovial nu conține fibrinogen, deci nu are tendință la coagulare; în schimb, se găsește în cantitate mare acid hialuronic puternic polimerizat, care conferă vîscozitatea lichidului sinovial și contribuie la proprietatea lui de a fi lubrifiant al articulației. Viscozitatea lichidului sinovial depinde și de pH, de osmolaritate, de temperatură. Acidul hialuronic este secretat în special de sinoblaste; el controlează mobilitatea cationilor în fluid, rata de difuziune a particulelor și moleculelor mari în soluție, inhibă rata de sedimentare a acestora, reglează componenta proteică, intervine ca un factor de legare în ciclul nutrițional al cartilajului avascular. În lichidul sinovial se găsesc și celule al căror număr variază mult de la o articulație la alta, și de la o specie la alta. Pe mm^3 sînt prezente: aproximativ 50% monocite, 15% macrofage, 14% fagocite incomplet activate, 1% celule primitive, 3% celule sinoviale descuamate, 5% alte tipuri de leucocite. Lichidul sinovial conține și enzime ca proteaze, fosfataza alcalină. Funcția lichidului sinovial este de a lubrefia suprafețele articulare ușurînd astfel alunecarea lor, precum și de a asigura nutriția cartilajului articular lipsit de vase.

f) Modificări patologice ale articulațiilor. Articulațiile suferă modificări semnificative în cursul proceselor de îmbătrînire a organismului sau al diferitelor afecțiuni. În senescență apare, ca o consecință considerată normală, *osteoartrita* care începe cu o rupere a supra-feţelor cartilajelor articulare. Cartilajul articular își pierde forma și uneori dispare în totalitate, expunînd suprafața osoasă îngroșată și lucioasă ca o marmură. Aceste oase pot conține, adiacent suprafeței lor, chisturi pline cu țesut lax fibromixoid. În jurul marginilor cartilajului pot apărea depuneri de calciu sub formă de osteofite sau endostoze, care limitează mișcările articulației. În unele cazuri, și mai ales la tineri, formațiunile articulare și cavitățile articulației se refac spontan; în unele cazuri de osteoartrite procesele de degenerare și regenerare osoasă se află într-un echilibru perfect. Procesul osteoartritic de vîrstă, ca de altfel și cel postinflamator, sînt însoțite de scăderea uneori totală a proteoglicanilor cartilajului articular, de scăderea activității de sinteză a acestora, de către condroblastele cartilajului articular și de către sinoblaste. Ca urmare a scăderii proteoglicanilor, fibrele și fibrilele colagene din matricea cartilajului articular hialin devin vizibile și, cu timpul, iau aspectul urzelii dintr-un covor, fenomen numit *„fibrilația" cartilajului*. Componența unor articulații joacă un rol important în predispoziția cartilajului articular de a degenera, în procesul de îmbătrînire a organismului. Deoarece nici

Scanned with OKEN Scanner

o articulație nu are formă perfect sferică, ca este adeseori incongruentă. Datorită presiunilor locale mari, incongruența accentuată duce la degenerări puternice, în timp ce incongruența redusă — la grade mai mici de alterare a cartilajelor articulare. Aceasta depinde și de nutriția cartilajului de către lichidul sinovial, care, în articulațiile cu incongruență redusă poate ajunge pe toată întinderea suprafețelor articulare realizînd buna hrănire a lor. Modificări ale structurilor articulare pot apărea și în mod patologic, în boli ca: *artrita reumatoidă* (boală cronică ce afectează în special articulațiile periferice; în lichidul sinovial se găsesc numeroase celule inflamatorii — cca 20 000—50 000), *artrita septică* (exces de PMN — aproximativ 100 000), *necroza avasculară* (osteonecroza ca o complicație comună a osteomielitei; în *boala Gaucher*, ori în metastaze tumorale), *guta* (precipitat de cristale de urați în lichidul sinovial și în țesuturile articulare), *condrocalcinoza* (depozite interarticulare de dihidrați de pirofosfat de calciu) etc.

6.2.11.2. Sinartrozele

Sinartrozele, articulații semimobile și imobile, sînt reprezentate prin trei subtipuri:

a) *sinostozele* sînt articulații fixe, imobile, în care capetele articulare sînt unite prin țesut osos. Se întîlnesc în suturile oaselor craniene la adulți. La nou-născuți și în primii ani ai copilăriei, oasele craniului sînt unite prin țesut conjunctiv dens. Acesta se transformă treptat în țesut osos;

b) *sincondrozele* sînt articulațiile semimobile cu mișcări limitate. Capetele osoase sînt unite prin cartilaj hialin. Se întîlnesc la locul de unire a coastelor cu sternul. Capetele osoase pot fi unite și prin fibrocartilaj, așa ca la simfiza pubiană sau discurile intervertebrale;

c) *sindesmozele* sînt articulațiile semimobile cu mișcări limitate. Capetele articulare sînt unite prin țesut conjunctiv. Se întîlnesc în articulația tibiofibulară inferioară.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

BOURNE S. și colab. — The Biochemistry and Physiology of Bone, Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1972.

CHERUBINO P., KATAOKA K. — Scanning Electron Microscope Observations of the Synovial-Membrane of Rabbit. Joints after experimentally induced Hemarthrosis, *Arch. Histol. Jap.*, 1973, 35, 417.

HAM A., HARRIS W. — Repair and Transplantation of Bone. În: „Biochemistry and Physiology of Bone", Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1976.

HANKOKS N. — The Biology of Bone, Cambridge University Press, Londra, 1972.

JONES S., BOYDE A. — Some Morphologic Observations on Osteoclasts, *Cell. Tissue Res.*, 1977, 185, 387.

JOTEREAU F., LE DOUARIN N. — The Developmental Relationship between Osteocytes and Osteoclasts, *Rev. Biol.*, 1978, 63, 253.

OWEN J. și colab. — Scientific Foundations of Orthopedy and Traumatology, William Heinemann, Medical Books, Londra, 1980.

RAMAGEN W. — The Bone Cell System: Form and Function, *Beitr. Pathol.*, 1973, 150, 1.

SIMKISS K. — Bone and Mineralization, Edward Arnold (Publisher) Ltd., Londra, 1976.

STOCKWELL R. — Cartilage Cells. Cambridge University Press, Londra, 1979.

WAUGHAN J. — The Physiology of Bone, Claredon Press, 1979.

WRIGHT W. și colab. — The structure of the Joints. În: „Intern. Rev. Connect. Tiss. Res.", Academic Press Inc. Ltd., Londra, 1975.

Scanned with OKEN Scanner

SÎNGELE (SANGUIS)

7.1. DEFINIȚIE. GENERALITĂȚI

Sîngele sau țesutul sanguin reprezintă în organism un țesut special, derivat din mezenchim, care, prin elementele sale componente, asigură funcții complexe în organism. Sîngele, țesutul lichid al organismului, este format din plasma sanguină și elementele figurate sau celulele sanguine.

7.2. PLASMA SANGUINĂ (PLASMA SANGUINIS)

Plasma sanguină (*plasma sanguinis*), partea lichidă a sîngelui, reprezintă aproximativ 5% din greutatea corpului, adică 3 500 ml la omul normal, în greutate de 70 kg. Ea este formată în principal din apă, aproximativ 90% și diferite substanțe, în proporție de aproximativ 10%. Dintre acestea din urmă procentul cel mai mare — aproximativ 97 — este reprezentat de proteine, dintre care albumine 55%, globuline 38% (globuline alfa 14%, beta 13%, gamma 11%) și fibrinogen 7%. În cantități mai mici se găsesc în plasmă: hormoni, vitamine, lipoproteine, hidrocarbonate, diferiți metaboliți, ioni.

Proteinele plasmatice au rol important în reglarea volumului sanguin, în menținerea balanțelor lichidelor organismului și contribuie în același timp la vîscozitatea sîngelui. Proteinele exercită o forță de aproximativ 25 mmHg (presiune oncotică) asupra peretelui capilar, permițînd apei să intre în sînge la acest nivel. Unele proteine plasmatice servesc drept transportor pentru unii hormoni cum sînt cei tiroidian, corticosuprarenali și gonadali. În unele boli (sprue, boli hepatice, nefroze) concentrația proteinelor scade în sînge realizîndu-se hipoproteinemia. Ca defecte genetice pot apărea agammaglobulinemia (lipsa de gammaglobuline, cu rezistență scăzută la infecții) sau afibrinogenemia (cu defect în coagularea sîngelui).

Pe lîngă proteine, plasma sanguină conține o cantitate mică de *lipide*, asociate cu proteinele sub formă de lipoproteine, precum și o cantitate mică de *hidrocarbonate*, reprezentate în special prin glucoză.

Scanned with OKEN Scanner

Plasma sanguină transportă diferiți *metaboliți* ca uree, acid uric, creatină, creatinină etc. în proporții bine cunoscute, care oferă, prin modificările fiziopatologice ce pot surveni, o posibilitate de apreciere a stării de sănătate sau de boală a organismului. Pe lîngă aceste substanțe organice, în plasma sanguină se află dizolvate și *săruri anorganice* în proporție de aproximativ 0,9%.

7.3. CELULELE SANGUINE

Celulele sîngelui sînt reprezentate prin trei tipuri majore:
— leucocitele sau globulele albe (*leucocytus*);
— eritrocitele sau globulele roșii (*erythrocytus*);
— plachetele sanguine sau trombocitele (*thrombocytus*) (fig. 7.1 și planșa 7.1).

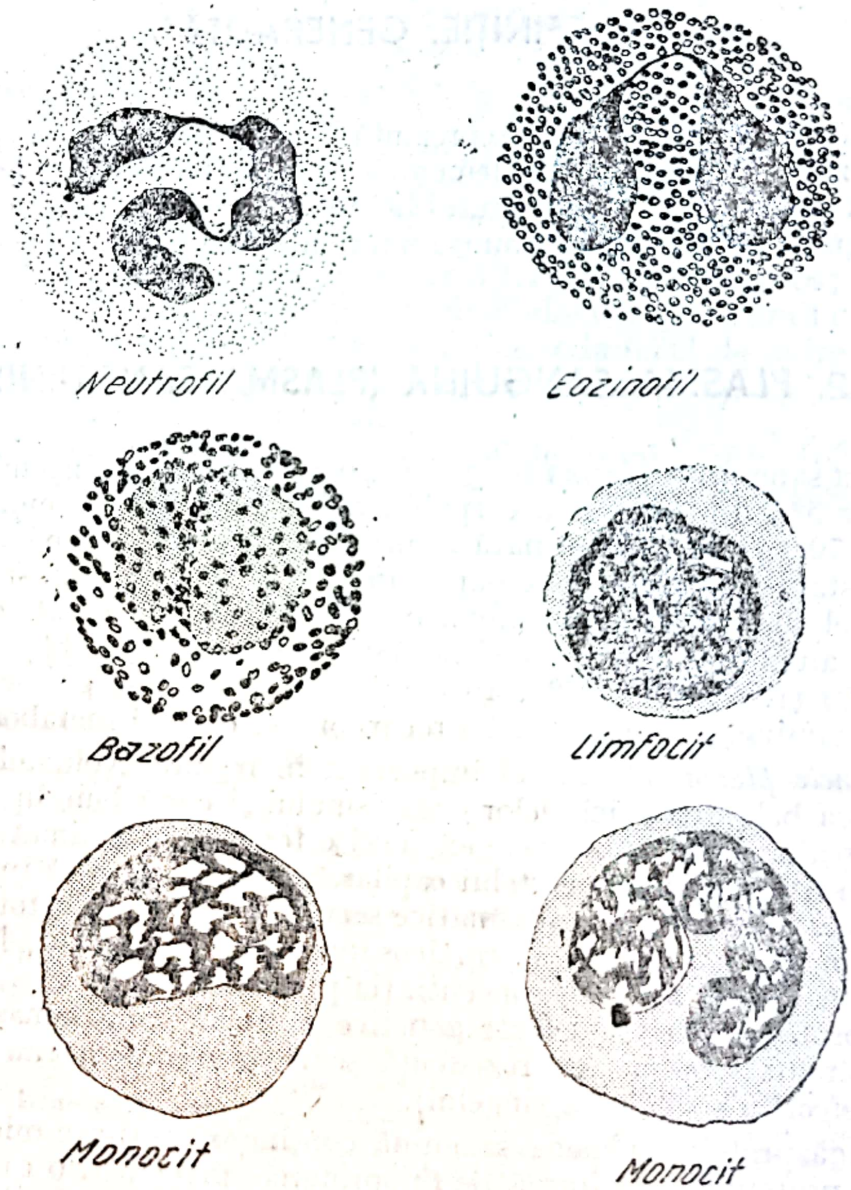


Fig. 7. 1. — Schema tipurilor de leucocite circulante.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.1. LEUCOCITELE

Leucocitele, sau globulele albe, se găsesc în sîngele circulant în proporție de 4 000—10 000/ml. La naștere numărul lor este de 15 000—25 000/ml. Acesta scade de la aproximativ 12 000/ml după 4 zile de la naștere, la 8 000—10 000/ml la 4 ani și apoi la valori asemănătoare cu ale adultului, după 12 ani.

Leucocitele se împart în două clase majore:

Granulocite (posedă numeroase granule în citoplasmă) sau *polimorfonucleare* = PMN (deoarece au nucleul lobat și de forme diferite).

Agranulocite sau *leucocite agranulare* (au granule puține sau chiar deloc în citoplasmă) sau *mononucleare* (nucleul este unic, nesegmentat).

Granulocitele, sau leucocitele granulare, se împart, la rîndul lor, în trei clase, după tinctorialitatea granulelor specifice din citoplasmă:

— granulocite neutrofile (*granulocytus neutrophylus*);
— granulocite eozinofile (*granulocytus eosinophylus*);
— granulocite bazofile (*granulocytus basophylus*).

Agranulocitele sînt de două tipuri:

— limfocite (*limphocytus*);
— monocite (*monocytus*).

Proporția diferitelor tipuri de leucocite din sîngele circulant realizează *formula leucocitară* care în mod normal este alcătuită astfel:

		Formula leucocitară
neutrofile	40—75%	2 000 —7 500 × 10^6/l
eozinofile	1— 5%	40 — 440 × 10^6/l
bazofile	0,1%	0 — 100 × 10^6/l
limfocite	20—45%	1 500 —3 500 × 10^6/l
monocite	2—10%	200 — 800 × 10^6/l

Numărul leucocitelor ca și procentul lor în sîngele circulant suferă modificări fiziologice și patologice. Creșterea numărului de leucocite poartă denumirea de *leucocitoză*, iar scăderea numărului de leucocite poartă denumirea de *leucopenie*. La adult și în prima copilărie numărul leucocitelor este mai mare iar la bătrîni scade. În raport cu *sexul*, la femeile adulte numărul granulocitelor este mai mare decît la bărbați. La bătrînețe valorile sînt asemănătoare. Există și *variații diurne* cu creșteri pînă la peste 10—15% de granulocite. Cel mai mic număr de leucocite granulare este dimineața după repaus, activitatea diurnă sporind numărul lor. *Efortul fizic* mărește proporția lor în sîngele circulant cu peste 30 × 10^9/l. Numărul lor crește și în stările de *stres* sau *postprandial*. Leucocitoză poate apărea și în *sarcină* cu creșterea PMN peste 15 × 10^9/l sau la *fumători*, cu peste 30% față de valorile normale.

În raport cu *procentajul diferitelor tipuri de leucocite* din sîngele periferic se descriu modificări fiziologice, patologice sau ereditare. Astfel în unele zone din Africa sau la populația de culoare din S.U.A. există tendințe de inversare a raportului neutrofil/limfocit, primele fiind scăzute, secundele predominînd. Numeric există și diferențe de sex: la femei numărul neutrofilelor crește la menstruație dar scade după menopauză. Variații diurne apar

Scanned with OKEN Scanner

în special pentru eozinofile, cu diferențe de pînă la 100% între limita inferioară dimineața și limita superioară noaptea. Modificarea numărului granulocitelor, aflate în principal sub controlul cortexului suprarenal, depinde de fluctuația diurnă a glucocorticoizilor.

7.3.1.1. Leucocitele granulare

7.3.1.1.1. Neutrofilul (Granulocytus neutrophylus)

Număr

În sîngele periferic neutrofilele se găsesc în proporție de 40—75% de elemente albe. Creșterea numărului de neutrofile, numită *neutrofilie*, se întîlnește fiziologic, dar mai ales patologic, în infecțiile acute. Scăderea numărului de neutrofile, numită *neutropenie*, apare mai ales în patologia sîngelui dar și în unele infecții sau boli generale ale organismului.

7.3.1.1.1.1. *Forma celulei* este rotunjită în sîngele circulant. Ea se modifică în momentul în care neutrofilele se detașează pentru a părăsi vasul și a trece în țesuturi. Prin emiterea de pseudopode, neutrofilul ia o formă neregulată, adeseori de rachetă.

Diametrul neutrofilului. În stare proaspătă este de 12—15 μm și numai de 9—12 μm, cînd celula este uscată (pe frotiul sanguin).

7.3.1.1.1.2. *Structura și ultrastructura neutrofilului.* Neutrofilul este o celulă ce prezintă un nucleu caracteristic, citoplasmă și membrană celulară. *Nucleul* este segmentat, prezentînd 2—5 lobi nucleari legați între ei prin filamente fine de cromatină. Așezarea lor în neutrofil realizează forme diferite, asemănătoare literelor din alfabet (U, V, Y, T, S etc.); fiecare lob nuclear prezintă eucromatină situată central și heterocromatină dispusă sub membrana nucleară (fig. 7.2 și planșa 7.2).

La unul din lobii nucleari, la 1—5% din neutrofilele sexului feminin, se observă prezența *corpusculului sexual Barr*, care reprezintă condensarea în intercineză a unuia dintre cei doi cromozomi X. La bărbați cromozomul Y este mult mai mic ca dimensiuni și nu poate fi observat la examenul obișnuit, cu microscopul optic. Poate fi însă cu greu observat în 3,5% din neutrofile prin fluorescență, după colorare cu chinacrină. Corpusculul sexual apare la microscop ca o prelungire a lobului nuclear sub forma unui băț de tobă. Cu cît neutrofilul este mai tînăr, cu atît numărul lobilor nucleari este mai mic (2 lobi), pentru ca la neutrofilul matur, foarte diferențiat, să sporească la 4—5 lobi.

În *formula Arneth* procentajul neutrofilelor după numărul de lobi este următorul:

— cu nucleu nesegmentat	0—5
— cu nucleu segmentat cu 2 lobi	14—30
— cu nucleu segmentat cu 3 lobi și peste	40—50

Aceste indicații se înscriu pe un grafic. Anomaliile patologice apar printr-o deplasare la stînga sau la dreapta a curbei înregistrate.

Scanned with OKEN Scanner

Citoplasma neutrofilului este uşor acidofilă. Ea conţine organite celulare comune, puţin dezvoltate, reprezentate prin reticul endoplasmic, complex Golgi, mitocondrii, doi centrioli, rare microfilamente şi vacuole lipidice. Apar frecvent microtubuli, numeroase particule de glicogen cu diametrul de 50—200 μm, vacuole de pinocitoză. Pe lîngă acestea, elementul structural caracteristic este reprezentat în citoplasmă prin numeroase *granule*, formate în complexul Golgi în locuri diferite ale organitului, avînd un diametru de 0,1—0,8 μm, colorate roz-palid în coloraţia panoptică. Diametrul şi colorabili-

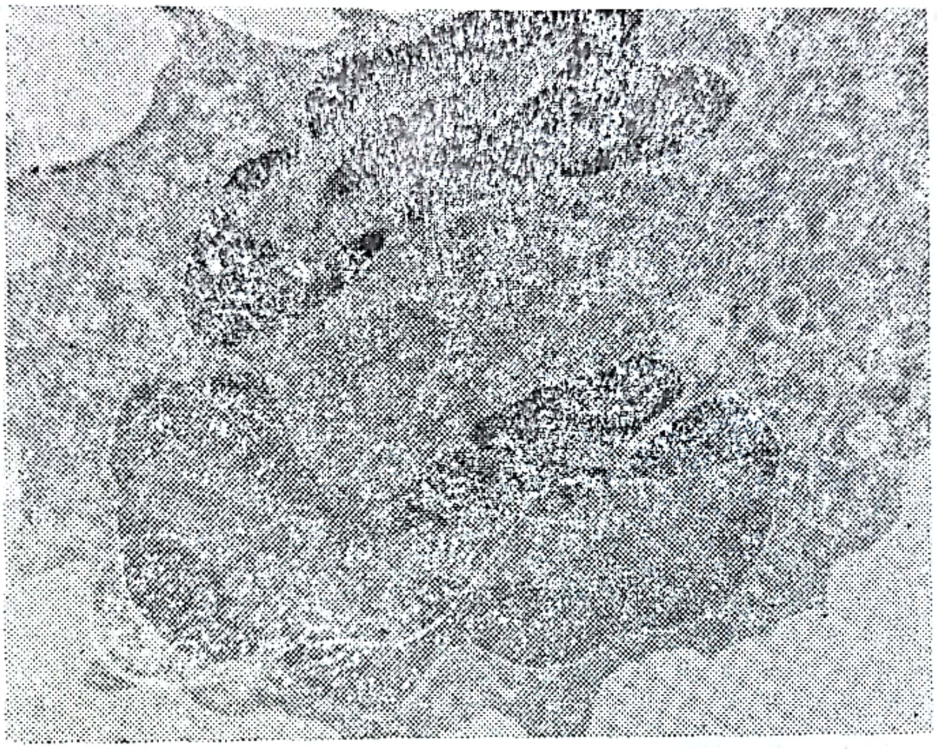


Fig. 7. 2. — Neutrofil (imagine electronooptică X 27 500).

tatea lor diferă mult de la o specie de mamfiere la alta, ceea ce a făcut ca ele să fie denumite şi *heterofile*. La om, numărul lor diferă de la o celulă la alta, fiind cuprins între 50 şi 200. Fiecare granulă este delimitată de endomembrane. Granulele se deplasează în citoplasmă datorită mişcărilor browniene, cu o amplitudine de 1 μm. Ele se pot mişca şi în grup sau izolat dintr-o zonă în alta a citoplasmei, cu o amplitudine de 2—3 μm. Granulele neutrofilului sînt de două tipuri: *granule azurofile sau primare* şi *granule specifice sau secundare*.

Granulele azurofile primare, numeroase şi prezente în exclusivitate în primele etape de dezvoltare a neutrofilului la nivelul măduvei hematogene, începînd de la stadiul de promielocit, se reduc treptat, pe măsura diferenţierii celulei şi trecerii ei în sîngele periferic. Începînd cu stadiul de mielocit apar treptat şi granule secundare specifice, astfel că în celulele diferenţiate proporţia granulară este reprezentată prin 20% granule azurofile şi 80% granule specifice. Granulele azurofile sînt lizozomii din neutrofile. Ei conţin *hidrolaze acide* ca fosfataza acidă, dezoxiribonucleaza acidă, beta-glucuronidaza, beta-galactozidaza, esteraza, lipaza etc. Pe lîngă acestea, granulele

azurofile mai conţin lizozim, complex enzimatic cu rol de a hidroliza glicozidele din peretele bacteriilor, devenind astfel un agent bacteriostatic. Granulele azurofile mai conţin şi enzima *mieloperoxidaza*, care, acţionînd asupra H_2O_2, eliberează şi activează O_2, devenind bactericide. La om, majoritatea granulelor azurofile sînt mieloperoxidazic-pozitive.

Granulele specifice secundare conţin lizozim, lactoferin; acesta din urmă este un complex enzimatic cu rol de a lega fierul circulant sustrăgîndu-l bacteriilor, care, în lipsa fierului, nu se vor mai putea dezvolta şi vor intra într-un ciclu involutiv. Granulele specifice mai conţin compuşi cationici bogaţi în arginină şi lizină, numiţi *fagocitine* (cu rol bacteriostatic), fosfatază alcalină, iodizi, peroxizi, clorizi, acid lactic, acizi graşi şi lecitine — toate avînd rol inhibitor asupra dezvoltării microorganismelor.

Genetic sau patologic pot apărea neutrofile în ale căror granule lipsesc una sau mai multe enzime, cum ar fi mieloperoxidaza, fosfataza alcalină, alte enzime lizozomale sau alţi compuşi ai granulelor secundare specifice. De asemenea pot apărea granule cu diametru mare şi forme neregulate.

Membrana celulară, lipoproteică, acoperită de glicocalix, emite frecvent pseudopode bogate în microfilamente şi microtubuli ce asigură migrarea celulei din sînge către şi prin ţesuturi (fig. 7.3).

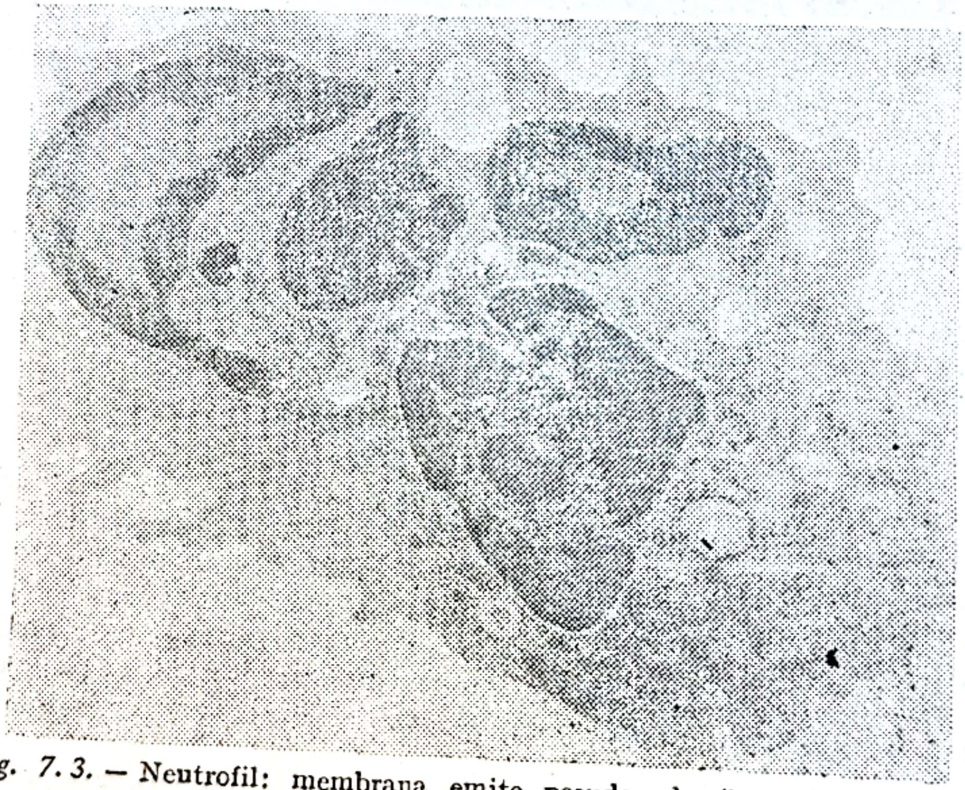


Fig. 7.3. — Neutrofil: membrana emite pseudopode (imagine electronooptică × 21 000).

Originea neutrofilului. După naştere neutrofilele se formează din măduva roşie hematogenă; trec apoi în sîngele periferic, unde rămîn pînă la 6—8 ore. După acest interval multe neutrofile trec în ţesuturi, în special în ţesuturile conjunctive, unde îşi desfăşoară activitatea şi se distrug fiind fagocitate de macrofage. Puţine neutrofile mor în sîngele circulant sau sînt eliminate prin tractul gastro-intestinal. Aproximativ 10^{11} neutrofile intră şi părăsesc corpul zilnic.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.1.1.1.3. *Funcțiile neutrofilului.* Neutrofilul este *microfag* sanguin; el fagocitează particule de talie mică, în general microorganisme (bacterii, virusuri) sau particule mici, inerte. Neutrofilele sînt primele leucocite care dau lupta cu microbii la locul de invazie a acestora.

În sîngele periferic se află două grupuri de neutrofile, respectiv *neutrofile circulante* și *marginale*, în proporții aproximativ egale. Neutrofilele marginale se mișcă ușor alunecînd de-a lungul endoteliului vascular, fără să adere

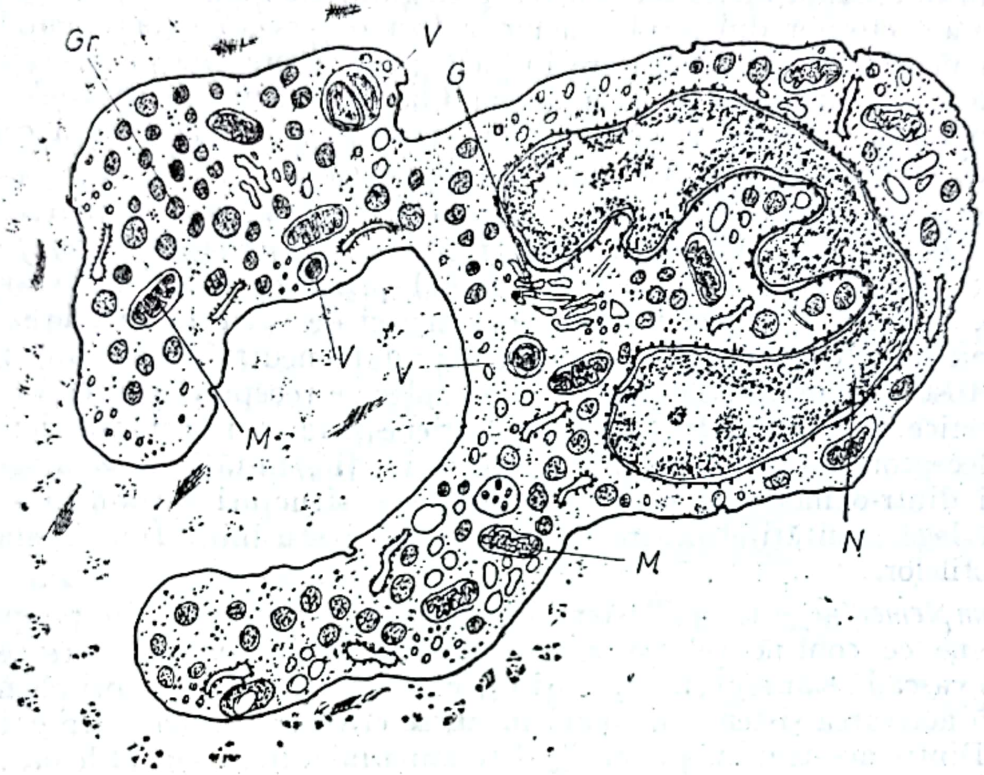


Fig. 7. 4. — Fagocitoza desfășurată de neutrofil prin emitere de pseudopode:
Gr — granulă; *G* — aparat Golgi; *M* — mitocondrie; *N* — nucleu; *V* — vacuolă fagocitară.

de el decît rareori și pentru scurt timp. În inflamații se intensifică marginația neutrofilelor care aderă la endoteliu, procesul fiind stimulat de diverși factori chemotactici granulocitari. Procesul de aderare este urmat de diapedeză (traversarea peretelui vascular), prin emitere de pseudopode de către neutrofil. Neutrofilele sînt printre cele mai rapide celule în locomoție, deoarece conțin aproximativ 10% actină din totalul proteinelor din citoplasmă (fig. 7.4).

Ajunse în țesuturi, ele migrează către locul de invazie microbiană în raport cu gradientele de stimuli chimici interceptați. Acești stimuli, sau *chemotaxine*, pot fi: diferiți metaboliți bacterieni (endotoxine), metaboliți elaborați de alte leucocite cum sînt limfocitele sensibilizate (factori chemotactici limfocitari), leucotriene, prostaglandine, lipide oxidate, unele peptide sintetice dintre care cel mai bine studiate sînt L-formil-metionin-peptidele, *factori serici*, din care în special componentele C_3' și C_{5a}'. Fagocitoza efectuată

de neutrofile se desfășoară în 5 etape, și anume: chemotaxia și motilitatea, opsonizarea, ingestia, degranularea, omorîrea intracelulară a microorganismelor.

Chemotaxia este proprietatea unei celule mobile, în cazul de față a neutrofilelor, de a recunoaște și a răspunde la diferiți stimuli care să determine migrarea prin țesuturi către zona inflamatorie. *Chemokinezia* este reacția prin care substanțele chimice determină viteza de locomoție.

Microorganismele elaborează factori chemotactici, *chemotaxine*, în prezența sau în absența factorilor din serul sanguin. Elaborarea chemotaxinelor în absența factorilor din serul sanguin a fost observată experimental, prin folosirea peptidelor sintetice, care inițiază sinteza proteinelor bacteriene și semnalează prezența acestora în organism. Chemotactismul neutrofilelor poate fi declanșat, în absența factorilor serici, și printr-o interacțiune a celulelor cu uratul monosodic sau prin pirofosfatul de calciu.

Dar stimularea chemotaxiei neutrofilelor se realizează în marea majoriate a cazurilor de către *factori chemotactici mediați de sistemul complement*, care este socotit a fi și mediatorul umoral principal în reacțiile antigen-anticorp. Recunoașterea factorilor chemotactici de către neutrofile se realizează prin receptori specifici, situați pe suprafața neutrofilelor. Pînă în prezent au fost demonstrate la om astfel de molecule receptori pentru C'_{5a}, peptide sintetice ca N-formil-metionin, leucotriene și factori chemotactici limfocitari. Receptorii de suprafață sînt considerați a fi „unități de recunoaștere", alcătuiți dintr-o moleculă sau un complex de structuri intramembranoase care vor lega „unități efectoare" ce vor declanșa sau iniția funcția specifică a neutrofilelor.

Complementul este un sistem multienzimatic format din polipeptide și proteine ce conține cel puțin 15 componente plasmatice, care se activează în cascadă sau secvențial. C'_3 și C'_5, cei mai puternici factori chemotactici după activarea sistemului complement, se clivează fiecare în fragmentele a și b. Dintre acestea, în special C'_{5a} determină migrarea neutrofilelor, monocitelor și eozinofilelor.

În serul sanguin se mai găsesc și alte sisteme chemotactice secvențiale, cum ar fi *sistemul kalikreina*, care se activează sub influența *factorului Hagemann* — o globulină plasmatică, și *sistemul fibrinolizei*.

După ce factorii chemotactici sînt receptați de neutrofile, în aceste celule se activează esteraza, metabolismul acidului arahidonic și a șuntului hexozo-monofosfat. Este stimulată de asemenea producerea de hidrogen peroxid (H_2O_2), cu eliberarea ulterioară de O_2. Are loc un eflux de sodiu, potasiu și calciu. Neutrofilul emite pseudopode, care conțin multe microfilamente de actină și miozină, precum și microtubuli care ajută la mobilizarea celulei și la migrarea ei în țesuturi.

Opsonizarea stimulează fagocitoza prin legarea de suprafața microorganismelor sau prin învelirea acestora cu unii factori *(opsonine)* care să stimuleze motilitatea și chemotactismul neutrofilelor (fig. 7.5). Principalele opsonine pentru neutrofile sînt anticorpii, în special IgG, din care mai ales clasele Ig_1 și Ig_3, precum și componente ale complementului C'_3 și C'_5, în special C'_{5a}. Moleculele imunoglobulinelor IgG, mai precis porțiunea lor F_c, este recunoscută de receptorii de pe suprafața neutrofilelor, așa-numiții receptori F_c sau receptori IgG.

Scanned with OKEN Scanner

Ingestia sau fagocitoza microorganismelor se efectuează după ce acestea au fost opsonizate. Ele sînt apoi fagocitate prin pseudopode emise de neutrofil. Aceste pseudopode fagocitare se mișcă circumferențial, mai mult sau mai puțin simetric în jurul microorganismelor, pînă cînd vîrfurile se întîlnesc în partea distală a particulei ce urmează a fi endocitată. Virfurile pseudopodelor fuzionează și închid particula în interiorul unei vacuole delimitată de o endomembrană. În cazul particulelor învelite cu IgG și complement (bacterii, virusuri, eritrocite, limfocite) endocitoza este rezultatul unei interacțiuni secvențiale între liganzii de pe suprafața particulei (porțiunea F_c a IgG și componenta C_3' a complementului) și receptorii specifici pentru acești liganzi de pe membrana fagocitului.

Mișcarea pseudopodelor în jurul microorganismelor este ajutată de microfilamentele de actină și miozină. Liganzii opsoninelor, ce sînt distribuiți pe suprafața particulelor ce urmează a fi ingerate, interacționează cu receptorii membranei de suprafață ai pseudopodelor neutrofilului. Energia necesară fagocitării este primită pe calea glicolizei anaerobe, fapt ce explică de ce fagocitoza se poate desfășura în condiții de anaerobioză, de exemplu în interiorul unui abces.

Vacuola endocitată sau fagozomul este împinsă către centrul celulei cu ajutorul microtubulilor. Fagozomul se unește în primul moment cu granulele secundare și numai după aceea cu granulele azurofile primare. Conținutul granulelor descărcat în interiorul fagolizomului astfel format va acționa în sens bactericid și de digerare a microorganismelor endocitate. Eliberarea conținutului granulelor în fagolizom duce la *degranularea neutrofilului*, proces în care granulele dispar din citoplasmă fiind revărsate în vacuola digestivă.

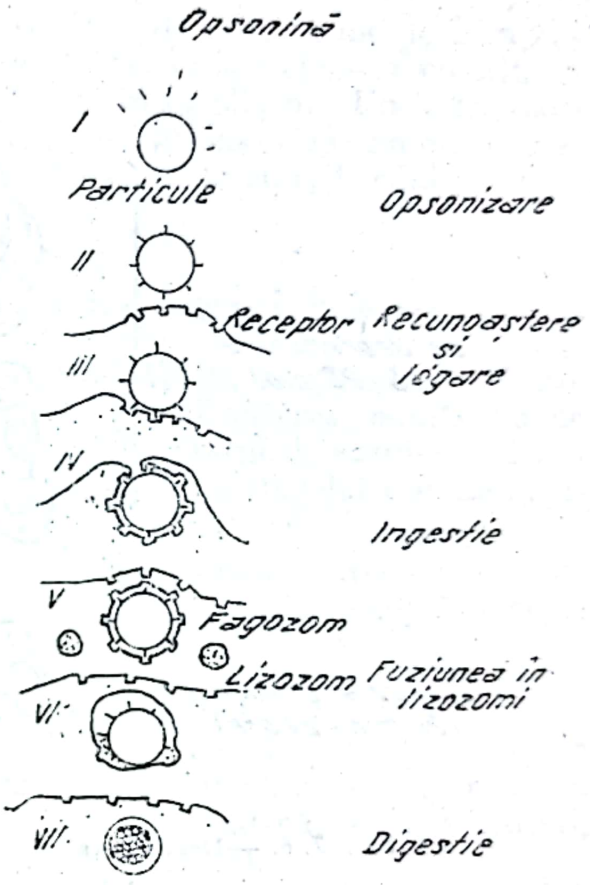


Fig. 7. 5. — Fagocitoza, opsonizarea și formarea fagozomului.

Degranularea este un proces activ ce necesită energie, cu consum de oxigen și creștere a metabolismului glucozei prin șuntul hexozomonofosfat (fig. 7.6). În unele condiții, în special patologice, enzimele lizozomale sînt eliberate în afara neutrofilului, în țesutul înconjurător asupra căruia acționează. Aceasta se poate întîmpla fie în urma morții celulei ca urmare a unor toxine, fie după distrugerea membranei celulare cu eliberarea întregului material intracelular, inclusiv a lizozomilor în țesutul înconjurător. Eliberarea enzimelor lizozomale în afara neutrofilului mai poate avea loc și din celula intactă, datorită unui defect de închidere a fagolizomilor al căror conținut este exocitat. În alte condiții, materialul digerat (urați, silicați) determină

Scanned with OKEN Scanner

ruperea endomembranelor lizozomilor al căror conținut se revarsă în citoplasma neutrofilului, fapt ce duce la moartea celulei prin liză.

Procesul de degranulare poate fi provocat nu numai de reacția de suprafață prin legarea microorganismelor opsonizate de către receptorii specifici ai neutrofilului, ci și prin perturbări nespecifice ale membranei celulare. Eliberarea enzimelor lizozomale în mediul pericelular, în acest ultim caz, poartă denumirea de *endocitoză inversă*. Acest mecanism stă la baza apariției unor alterări tisulare în multe boli, în care complexele imune sînt depozi-

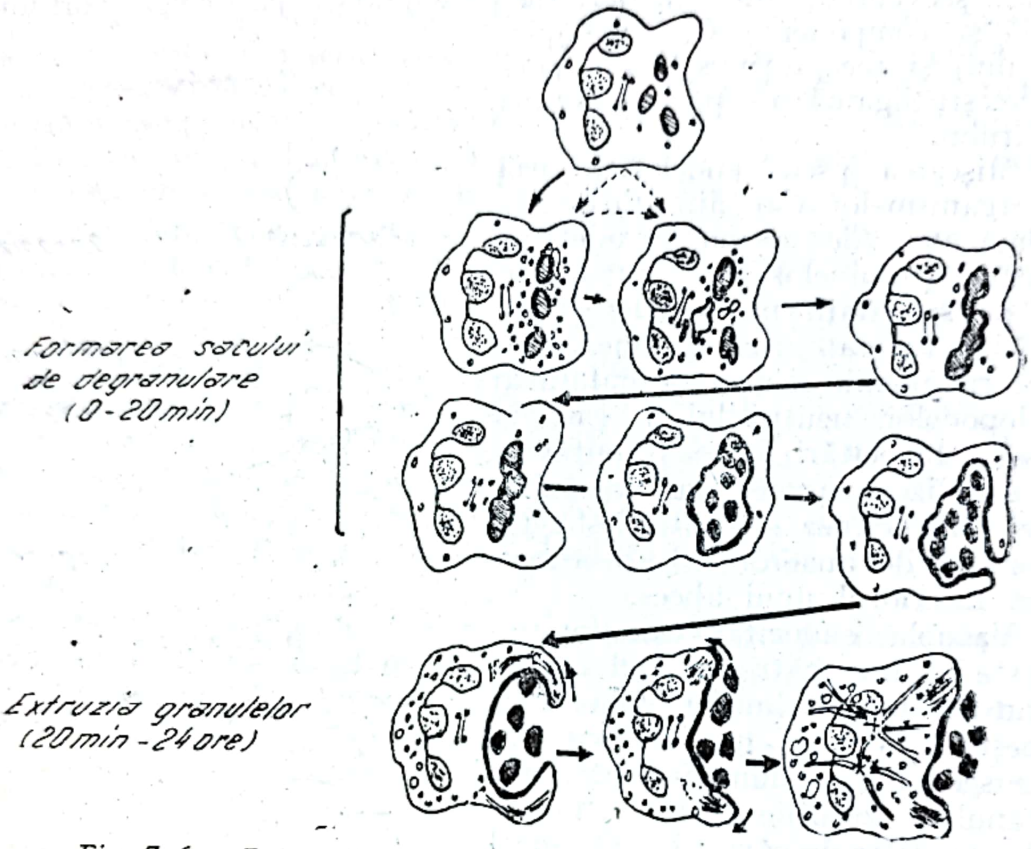


Fig. 7. 6. — **Degranularea neutrofilului și extruzia granulelor.**

tate pe suprafața neutrofilelor sau pe structuri extracelulare cum ar fi membranele bazale vasculare. Exocitoza granulară joacă și un important rol bactericid pentru microorganismele neingerate, mai ales prin mieloperoxidaza revărsată sau prin enzimele lizozomale care inhibă migrarea neutrofilelor, imobilizîndu-le în zonele de acumulare a macrofagelor, ceea ce reglează astfel tipurile de celule ce trebuie să migreze în interiorul focarelor inflamatorii.

Lipsa fenomenului de degranulare se poate observa ca defect genetic la unii indivizi, ceea ce atrage după sine lipsa de reactivitate a acestora la contactul cu microbii, deci rezistența mult mai scăzută sau chiar inexistentă la infecții a acestor indivizi.

Omorîrea microorganismelor în interiorul fagolizomului neutrofilului se face prin: *a)* sistemul dependent de oxigen și *b)* sistemul independent de oxigen.

Sistemul dependent de oxigen este mediat de *mieloperoxidază*, o proteină bazică ce leagă H_2O_2 și o halogenură (cofactor oxidabil) de suprafața microbiană. La 0,025% din populație, neutrofilele nu conțin mieloperoxidază, fără însă ca indivizii respectivi să prezinte predispoziție pentru infecții. La

aceştia există deci sistem dependent de oxigen dar independent de mieloperoxidază. Activitatea bactericidă are loc şi în aceste condiţii, dar mecanismul nu este încă elucidat, componentele implicate în acţiune fiind H_2O_2, anionul superoxid, oxigenul *single*, [care are formula oxigenului atmosferic (triplet), de care diferă prin distribuirea electronilor în jurul celor doi nuclei de oxigen] şi radicalii hidroxili.

Sistemul independent de oxigen, sau sistemul neoxidativ bactericid, include acţiunea proteinelor cationice, a lactoferinei, lizozimului, proteazelor active la pH neutru, histonelor nucleare eliberate în ţesuturi după moartea celulei, cu activitate antimicrobiană directă.

Soarta microorganismelor ingerate depinde de puterea lor de a supravieţui în interiorul celulei. În general, după fagocitare ele sînt omorîte şi apoi digerate de enzimele lizozomilor revărsate în fagolizomi. Unele microorganisme sînt omorîte şi puţin digerate, altele nu sînt omorîte ci numai sechestrate în celulă. Exemple de microorganisme rezistente sînt: bacilul tuberculozei, bacilul leprei, *Legionella pneumophila*.

7.3.1.1.2. Eozinofilul (Granulocytus eosinophylus)

Număr. Eozinofilul, numit şi granulocit acidofil, se găseşte în sîngele periferic în proporţie de 1—5% de elemente albe. Creşterea numărului de eozinofile, denumită *eozinofilie*, ca şi scăderea numărului de eozinofile, denumită *eozinopenie*, însoţesc mai ales stări patologice ale sîngelui sau ale organismului.

Forma celulei este rotunjită, diametrul ei fiind asemănător cu al celorlalte granulocite, de 12—15 μm la celula aflată în stare proaspătă şi de 9—12 μm la celula uscată.

7.3.1.1.2.1. *Structura şi ultrastructura eozinofilului*

Nucleul este de obicei bilobat, format din doi lobi uniţi între ei prin punţi fine de cromatină. Se pot întîlni în sîngele circulant şi eozinofile cu nucleu trilobat. Lobii nucleari conţin de obicei eucromatină, dispusă central, şi heterocromatină lîngă membrana nucleară (fig. 7.7).

Citoplasma, intens acidofilă, conţine organite celulare mai bine reprezentate decît în neutrofil, rare vacuole şi glicogen în cantitate redusă. În întreaga citoplasmă apar *frecvente granule*, de mărimi egale, cu diametrul de aproximativ 0,8—1 μm, ce se colorează în portocaliu-strălucitor în coloraţia May-Grünwald-Giemsa. Fiecare granulă este înconjurată de o endomembrană, iar cele mai mature prezintă în axul lor lung cu cristaloid electronodens, numit *internum*, rezistent la traumele mecanice şi liza osmotică. El conţine fosfolipide şi acizi graşi nesaturaţi. În granulă zona ce înconjură cristaloidul, numită *externum sau matrice*, apare mai clară. Ea este foarte bogată în fosfatază acidă. Granulele eozinofilului mai pot conţine şi alte hidrolaze acide de tip lizozomal cum ar fi glucuronidaze, catepsine, ribonucleaze, arilsulfataza. Mieloperoxidaza se găseşte în cantitate mai mare decît în granulele azurofile din neutrofil (fig. 7.8).

Membrana eozinofilului este organizată după tipul general al tuturor suprafeţelor celulare, lipoproteic acoperită de glicoproteine. La nivelul ei apar pseudopode rare şi mici, celula prezentînd mişcări ameboide.

Scanned with OKEN Scanner

Originea. Eozinofilul se formează în măduva hematogenă dintr-o celulă precursor neidentificată, fără să se poată preciza dacă este comună cu a neutrofilului sau diferită. Pe baza datelor actuale părerile înclină să admită formarea eozinofilului din aceeași celulă-stem multipotențială cu a granulocitului neutrofil. Primul stadiu celular, identificat în măduvă, este promielo-

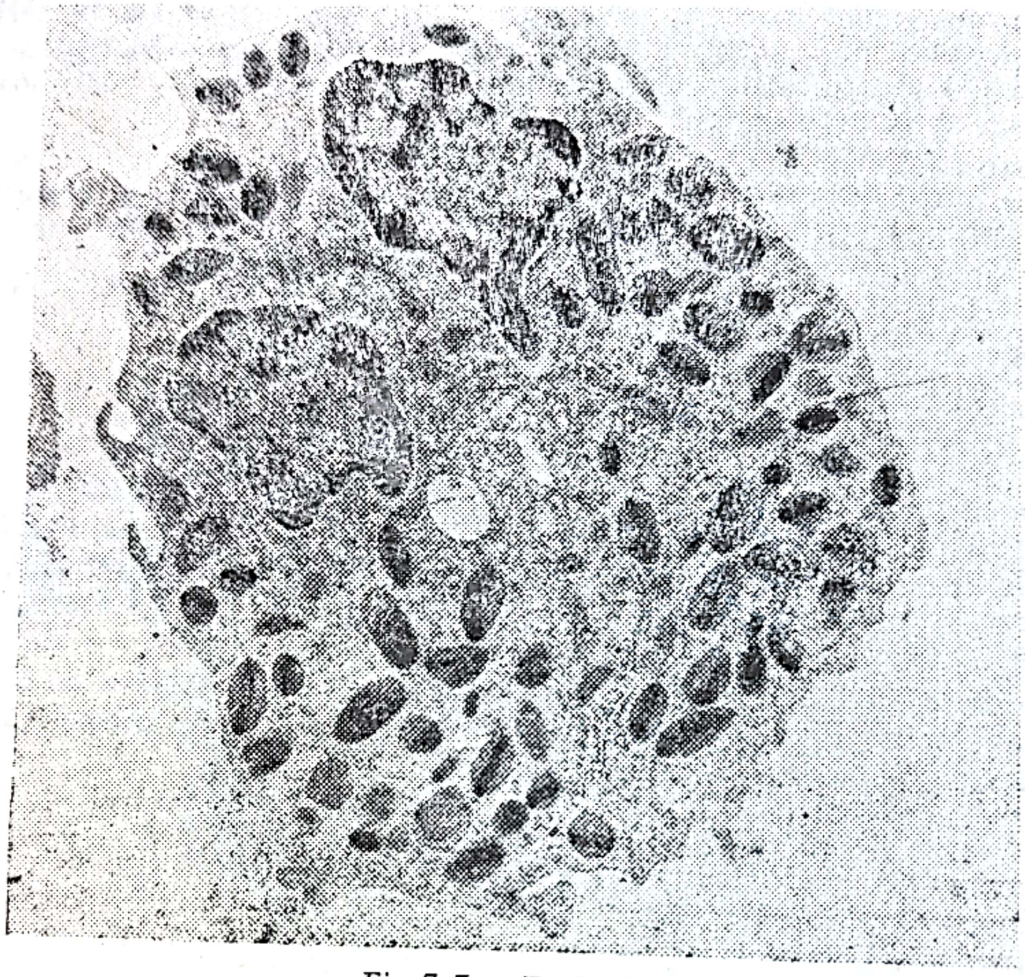


Fig. 7.7. — Eozinofil:
Gr — granulă; *G* — aparat Golgi; *N* — nucleu (imagine electronooptică × 19 800).

citul ce va forma în secvență în 22—30 ore, mielocitul, metamielocitul, eozinofilul nesegmentat și, în final, cel segmentat care trece în sîngele periferic. Tranzitul medular al seriei eozinofilului este de 5—6 zile. În sîngele periferic rămîne de obicei cîteva ore sau zile. Din sînge eozinofilele trec în țesuturi și se localizează în special în mucoasele tubului digestiv, uterului și vaginului, dar și în piele sau în alte țesuturi, unde își desfășoară activitatea și se distrug. Foarte puține eozinofile pot totuși să se reîntoarcă în sînge.

7.3.1.1.2.2. *Funcțiile eozinofilului.* Celula este un microfag cu putere redusă de fagocitoză dar mai selectivă pentru factorii bacterieni solubili, unele componente plasmatice, complexele antigen-anticorp, pe care le fagocitează cu formare de fagozomi în citoplasmă. După fuzionare cu lizozomii, enzimele hidrolitice ale *externum*-ului distrug materialul endocitat. *Internum*-ul rămîne intact multă vreme în fagolizom.

Scanned with OKEN Scanner

Printr-un mecanism incomplet elucidat, eozinofilele au un rol antihistaminic, acumulindu-se în țesuturile sau zonele cu histamină în concentrație ce depășește normalul. Eozinofilele intervin astfel în bolile parazitare și alergice, boli însoțite întotdeauna de eozinofilie. În tumori, în special în boala Hodgkin, eozinofilele prezintă reacții de apărare de tip imun. Eozinofilele

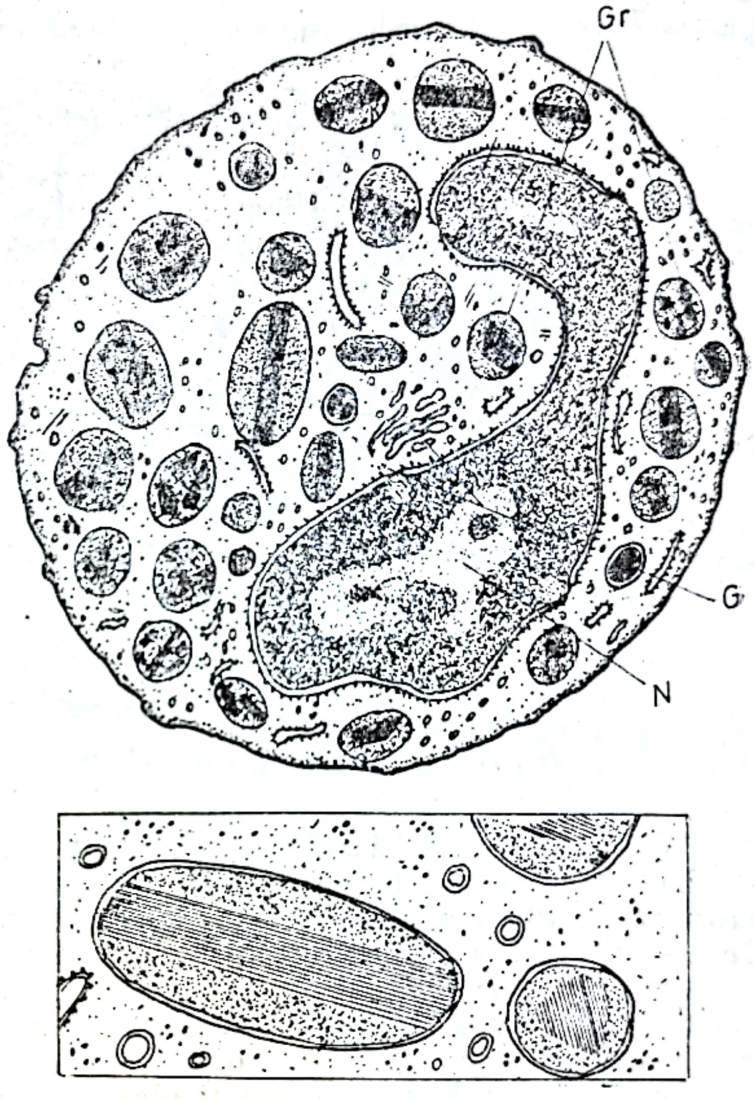


Fig. 7. 8. — Schema organizării ultrastructurale a eozinofilului; în cartuș schema mărită a unei granule din citoplasma eozinofilului.

conțin *profibrinolizină* prin care se pare că intervin în procesele de coagulare sanguină. Hormonii corticosteroizi secretați de suprarenale scad numărul eozinofilelor circulante, nu și al celor medulare.

7.3.1.1.3. Bazofilul (Granulocytus basophylus)

Bazofilele, sau granulocitele bazofile, se găsesc în sîngele periferic în proporție de 0,5% de elemente albe (o celulă la 200 de leucocite). Numărul crescut de bazofile circulante, ca și numărul lor scăzut, însoțesc de obicei boli ale sîngelui sau boli generale ale organismului. Numărul lor diferă și în raport cu vîrsta, fiind ceva mai bine reprezentate la nou-născut și copii. ACTH-ul și tireotoxicoza scad numărul bazofilelor circulante.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.1.1.3.1. *Forma celulei* este ușor rotunjită, iar *diametrul* este asemănător celorlalte granulocite, de 10—12 μm.

7.3.1.1.3.2. *Structura și ultrastructura bazofilului*

Nucleul apare incomplet segmentat, avînd adeseori forma unei frunze incomplet lobate sau a literei „S". În nucleu, eucromatina este egal răspîndită ca și heterocromatina și în ansamblu are aspect heterogen (fig. 7.9 și planșa 7.3).

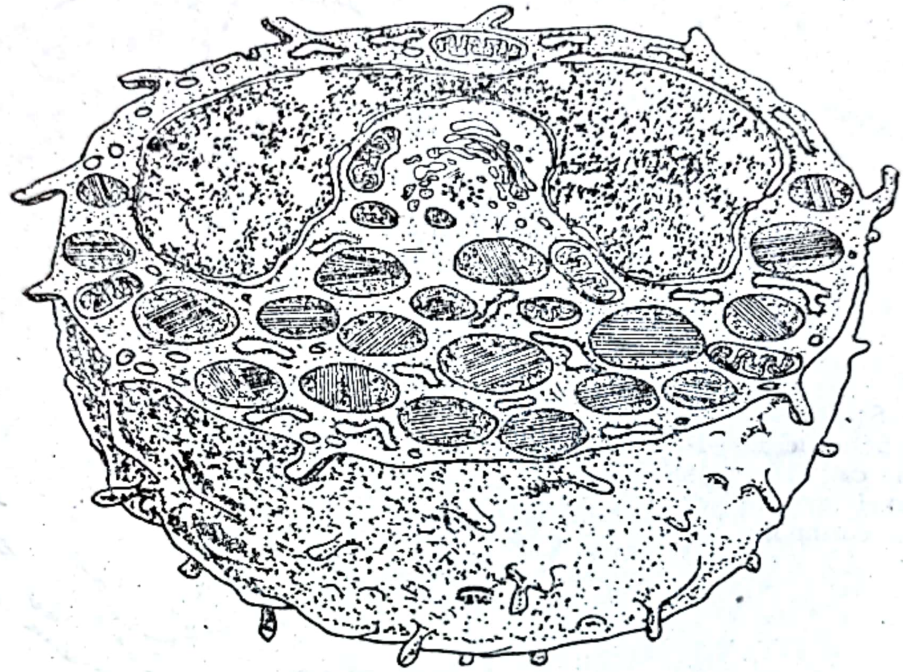


Fig. 7.9. — Schema organizării ultrastructurale a bazofilului.

Citoplasma este bazofilă, conține puține organite celulare, glicogen, dar multe *granule* de formă și dimensiuni diferite ce apar colorate metacromatic în albastru-violet închis. Diametrul granulelor este de 0,1—1 μm. În unele bazofile granulele sînt răspîndite pe toată aria citoplasmei, acoperind adeseori și nucleul. În altele, granulele apar concentrate în ectoplasmă sau perinuclear. Ele sînt foarte sensibile, dispar repede în apă datorită glicozaminoglicanilor acizi pe care-i conțin. Granulele sînt delimitate de o endomembrană. În unele granule pot fi observate cristale fuziforme sau hexagonale în secțiune transversală, prezentînd o periodicitate de 35 nm. O parte din granulele bazofilului sînt lizozomi, dar cele mai multe pot fi considerate granule specifice, diferite în conținut de ale neutrofilului. Granulele specifice conțin deci histamină (modificator al permeabilității capilare), heparină (anticoagulant), serotonină (5-hidroxitriptamina) și o substanță slab reactivă de natură lipidică, probabil din același grup cu prostaglandinele.

Membrana bazofilului este lipoproteică, acoperită de glicocalix. Pe suprafața ei externă se găsesc receptori pentru IgE.

Originea bazofilului este în măduva roșie hematogenă, avînd o celulă-stem multipotențială comună cu a neutrofilului și eozinofilului. Din măduvă, bazofilele sînt eliberate în sîngele periferic, unde rămîn scurt timp, apoi trec în țesuturi.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.1.1.3.3. *Funcțiile bazofilului.* Și acest leucocit granular este încadrat în familia macrofagelor, avînd o putere redusă de fagie. El se deplasează în țesuturi prin mișcări ameboide. Bazofilele intervin în stări inflamatorii, stări de șoc, de stres, datorită substanțelor prezente în granulele specifice pe care le eliberează la contactul cu unii antigeni.

7.3.1.2. Leucocitele agranulare

7.3.1.2.1. Limfocitul (Lymphocytus)

Limfocitul face parte din agranulocite sau mononucleare. Se găsește în sînge în proporție de 25—45% de elemente albe. Creșterea numărului de limfocite în sîngele periferic poartă denumirea de *limfocitoză* și se întîlnește mai ales în stări patologice, în inflamațiile cronice și, dintre acestea, îndeosebi în cele specifice (tuberculoză, sifilis etc.). Scăderea numărului de limfocite în sînge poartă denumirea de *limfocitopenie*, stare ce însoțește de obicei boli ale sîngelui sau boli generale ale organismului.

7.3.1.2.1.1. *Forma celulei.* Limfocitul circulant este rotunjit sau ușor oval.

Diametrul limfocitelor. Limfocitele mici, cele mai numeroase în sîngele periferic, au diametrul cuprins între 6 și 8 μm. În procent mai redus se găsesc în sîngele periferic și limfocite mijlocii sau limfocite mari, cu diametrul de 9—10 μm.

7.3.1.2.1.2. *Structura și ultrastructura limfocitului*

Limfocitul este o celulă completă. *Nucleul* este mare, indentat și ocupă partea cea mai întinsă din citoplasmă. În interiorul lui se găsește o cantitate mare de heterocromatină, sub formă de bulgări bazofili, ceea ce face ca pe frotiul sanguin să apară tahicromatic, intens colorat, ca o pată de cerneală. În nucleu se poate observa și prezența unui nucleol.

Citoplasma limfocitului este puțină, redusă la un inel perinuclear. Bazofilă, asemănată cu cerul senin, citoplasma conține granule azurofile, organite celulare slab reprezentate, rare vacuole, cristale și structuri tubulare. În citoplasmă sînt prezente activități enzimatice, dintre care mai caracteristice apar lipaza și enzimele lizozomale.

Membrana celulei, lipoproteică, organizată în mozaic, este acoperită de un strat subțire glicoproteic.

Durata de viață în sîngele periferic este diferită, fiind situată între cîteva zile și un an, dar unele limfocite pot atinge și vîrsta de 5—25 de ani. Această *heterogenitate limfocitară* sub aspectul viabilității, se datorește în principal *circulării și recirculării* acestor celule. Într-adevăr, limfocitele părăsesc vasul sanguin, trec în țesuturile conjunctive, unde își desfășoară în principal activitatea. Unele din aceste limfocite, după o intensă activitate locală, se distrug pe loc în țesuturile conjunctive, altele sînt eliminate prin tubul digestiv și plămîni. Dar cea mai mare parte dintre ele sînt fagocitate de macrofagele ganglionilor și foliculilor limfatici. Alte limfocite însă sînt preluate de către capilarele limfatice și, prin circulația limfatică, ajung din nou în circuitul sanguin. Ciclul reîncepe apoi dinspre sînge către țesuturi, astfel

Scanned with OKEN Scanner

că unele limfocite pot circula și recircula de 2—3 sau mai multe ori prin vasele sanguine. De obicei limfocitele B au viață mai scurtă, iar limfocitele T, viață mai lungă.

7.3.1.2.1.3. *Funcțiile limfocitului.* Limfocitele au capacitatea de a recunoaște proteinele proprii organismului în care se găsesc (proteine *self)* de proteinele străine ce pot fi introduse în organism (proteine *non-self)*, împotriva cărora limfocitele B secretă anticorpi (imunoglobuline) iar limfocitele T secretă limfokine (fig. 7.10).

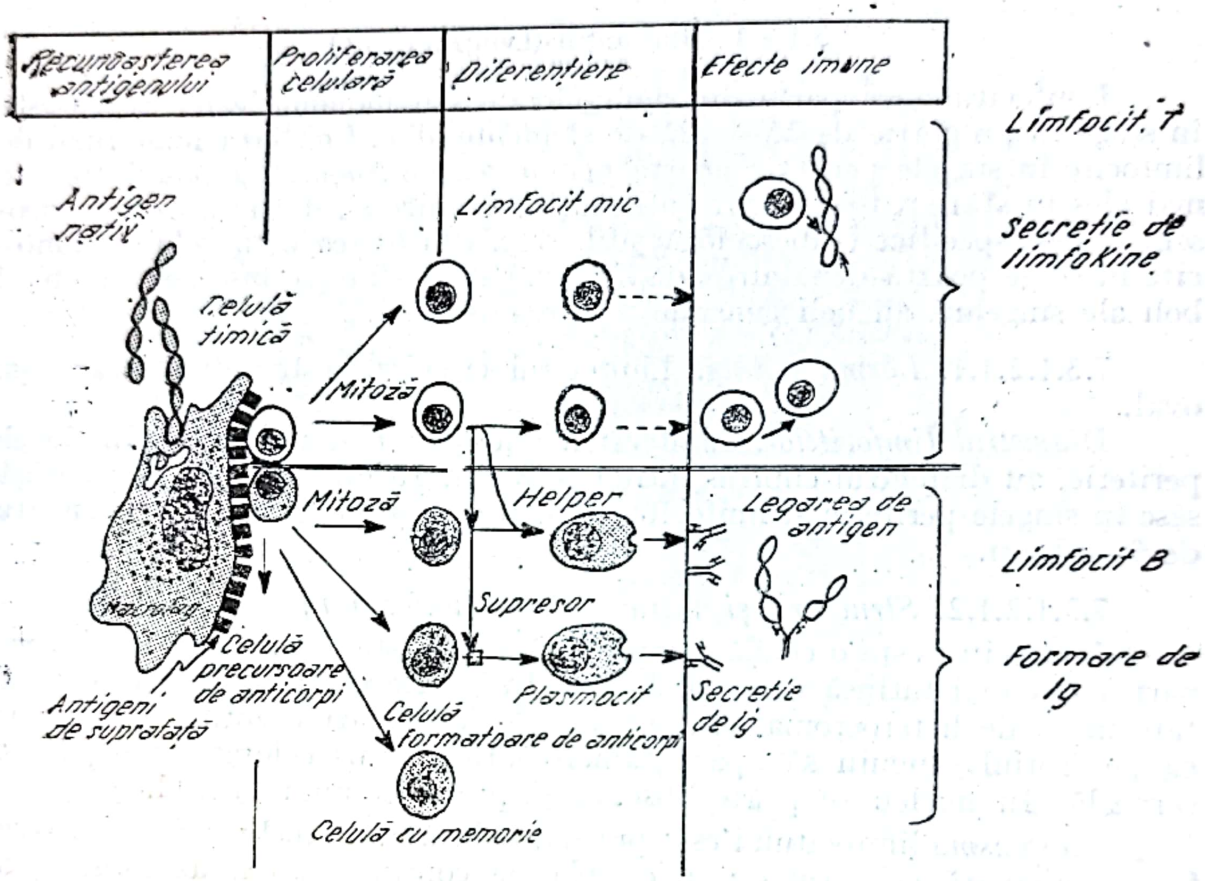


Fig. 7. 10. — Schema declanșării procesului imun, caracteristic pentru limfocitele B și limfocitele T.

Limfocitele prezintă *mișcări de locomoție* foarte active, la fel ca și granulocitele, cu o viteză de 35 μm/minut la 37°. În mișcare, limfocitul ia adesea forma de oglindă cu mîner (citoplasma + nucleul). Celula prezintă și *mișcări intracitoplasmatice* foarte vii, care deplasează organitele dintr-o parte în alta, în citoplasmă. Limfocitele nu fagocitează particule mari ci numai în puține situații — fragmente de eritrocite. În schimb endocitează activ particule mai mici de 1 μm diametru. Înainte de a fi internalizate, toate particulele și moleculele ce se prind pe suprafața limfocitului de receptori, sînt transportate într-o mică zonă a membranei, unde se grupează într-un fel de semicerc numit „cap", fenomenul luînd denumirea de *capping*. Adeseori se observă cum limfocitul se atașează de o altă celulă (macrofag, celulă epitelială) pe care o înconjură; este așa-numitul proces de *peripolesis* și se presupune că în acest fel se fac schimburi de informații între celulele respective.

Scanned with OKEN Scanner

Alteori, limfocitul pătrunde în cealaltă celulă — *emperipolesis* —, cele două celule rămînînd în simbioză. Se pot vedea astfel mitoze ale limfocitului în celulele hepatice, în celulele ovarului, intestinului, în celulele canceroase.

Deşi asemănătoare morfologic, studiile de mobilitate electroforetică, de topografie de suprafaţă, de răspuns la mitogeni, au arătat că limfocitele constituie o populaţie heterogenă cu celule de diferite mărimi, cu viaţă şi caracteristici imunologice variate.

O clasificare morfofuncţională împarte limfocitele în două clase majore:
— *limfocitele sau celulele B sau timoindependente;*
— *limfocitele sau celulele T sau timodependente.*
La acestea s-a adăugat o a treia clasă de limfocite:
— *limfocite citolitice non-B, timoindependente.*

7.3.1.2.1.4. *Limfocitele B*, timoindependente, se caracterizează prin capacitatea lor de a secreta imunoglobuline. Văzute la microscopul de *scanning*, suprafaţa externă a celulei B prezintă frecvente microvilozităţi ce conţin un număr mare de poziţii sau receptori de antigeni (aproximativ 160 000), situate, la limfocitele umane, la distanţă de aproximativ 100 nm una de cealaltă (fig. 7.11 şi 7.12). La alte specii, cum ar fi şoarecele, distanţa între

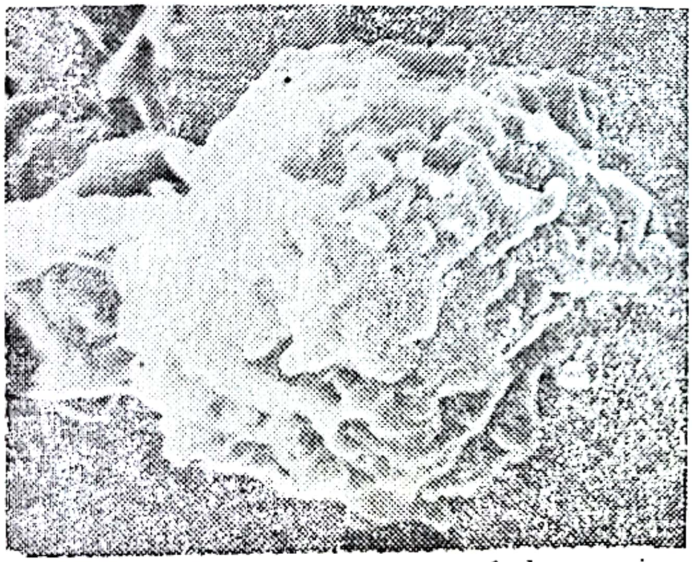


Fig. 7. 11. — Imagine la microscopul de *scanning* a limfocitului B.

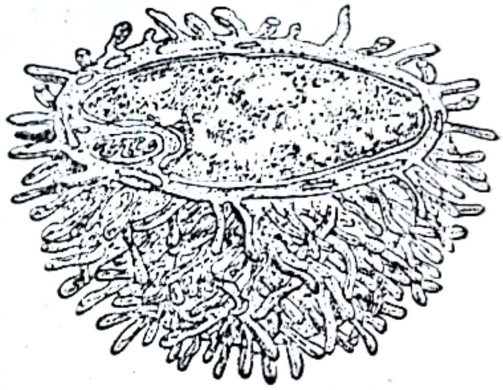


Fig. 7. 12. — Schema organizării suprafeţei limfocitului B (numeroşi microvili).

receptorii de suprafaţă este mult mai mică — de numai cîţiva nm. Unele limfocite B au pe suprafaţa externă receptori de legare a imunoglobulinelor sub formă de agregate sau complexe imune.

La om şi la alte specii de mamifere poziţiile antigenice reprezintă de fapt prezenţa la locusurile respective a imunoglobulinelor de suprafaţă. Dintre acestea, preponderent sînt reprezentate IgM, în formă monomerică. IgD, IgG şi IgA pot fi şi ele prezente, în proporţii mai reduse decît IgM. În unele situaţii speciale, pe suprafaţa aceluiaşi limfocit, pot exista în acelaşi timp IgM şi IgD.

Originea limfocitelor B. Celulele se formează în viaţa intrauterină cronologic în: ficat, splină şi măduva hematogenă, iar după naştere, în măduva hematogenă. La om, în viaţa intrauterină, primele limfocite B care produc

Scanned with OKEN Scanner

imunoglobuline (IgM) apar în ficat la fetusul de 9 săptămîni. Celulele B sînt angajate *(committed)* să producă imunoglobuline cu un singur tip de antigen (idiotip), angajare ce apare odată cu producerea primelor imunoglobuline. De asemenea clonele B sînt angajate să producă imunoglobuline cu un singur tip de lanţ L *(light)*, de exemplu kappa sau lambda dar nu pe amîndouă. Izolat, un limfocit B poate să producă şi imunoglobuline cu mai mult decît un singur lanţ proteic H *(heavy)*. De exemplu: celule B cu IgM şi IgD pe suprafaţa lor pot fi prezente în sînge, mai mult decît celule B cu o singură clasă de imunoglobuline de suprafaţă.

Limfocitele B părăsesc măduva hematogenă ca limfocite mici imunocompetente şi migrează în marea lor majoritate în organele limfoide secundare ca ganglioni limfatici, splină sau formaţiunile limfoide ale tubului digestiv. Migrarea limfocitelor este crescută în artrita reumatoidă, cînd în sinoviala articulară se organizează un organ limfoid secundar; de asemenea în tiroidă, în boala Hashimoto.

Funcţiile limfocitului B. Limfocitul B are rol important şi principal în realizarea *imunităţii umorale a organismului*. La contactul cu antigenii, limfocitele sintetizează imunoglobuline (anticorpi). Antigenii sînt reprezentaţi prin orice tip de structură chimică (diferite molecule izolate sau asociate cu virusuri, bacterii, celule) care stimulează limfocitul în a se transforma în celulă capabilă să genereze răspunsul imun (imunoblast) (fig. 7.13).

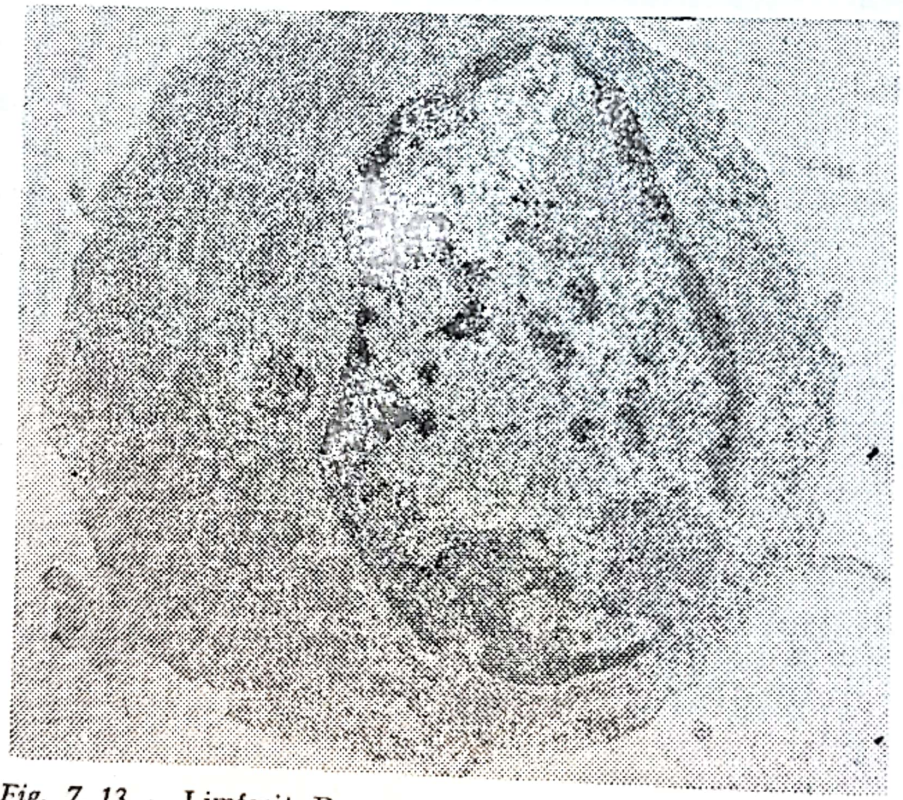


Fig. 7. 13. — Limfocit B pe cale de transformare în imunoblast (imagine electronooptică × 27 500).

Răspunsul imun primar are loc la primul contact al limfocitului cu antigenul. La acest contact limfocitele se blastizează, adică se transformă în *limfoblast sau imunoblast* pentru a sintetiza imunoglobuline. În această transformare, limfocitul creşte în volum, atinge diametrul de 10 μm şi chiar

Scanned with OKEN Scanner

îl depășește. Nucleul palid conține în cantitate mare eucromatină și 2—4 nucleoli. Citoplasma devine abundentă, bazofilă, la nivelul ei dezvoltîndu-se organitele celulare, în special cele de sinteză (reticul endoplasmic rugos, complex Golgi, mitocondrii). După activare, limfocitele B se divid prin mitoze repetate și dau naștere la *clone celulare B*. Din acestea, unele imunoblaste se diferențiază în plasmocite, celule secretoare de imunoglobuline. Alte imunoblaste se reîntorc la forma de limfocit circulant, devenind *celulă cu memorie*. Aceasta reține în memoria ei (în acizii nucleici) primul contact cu antigenii.

Anticorpii sintetizați sînt exocitați și depuși fie la suprafața membranei limfocitului, fie trecuți în sînge. Astfel procesul imunologic presupune formarea imunității umorale de către limfocitele B. *Imunitatea umorală sau imediată* este realizată deci prin formarea imunoglobulinelor de către limfocitele B — plasmocite, imunoglobuline sau anticorpi ce trec în sînge sau în lichidele extracelulare, declanșînd prin urmare o imunitate rapidă (fig. 7.14).

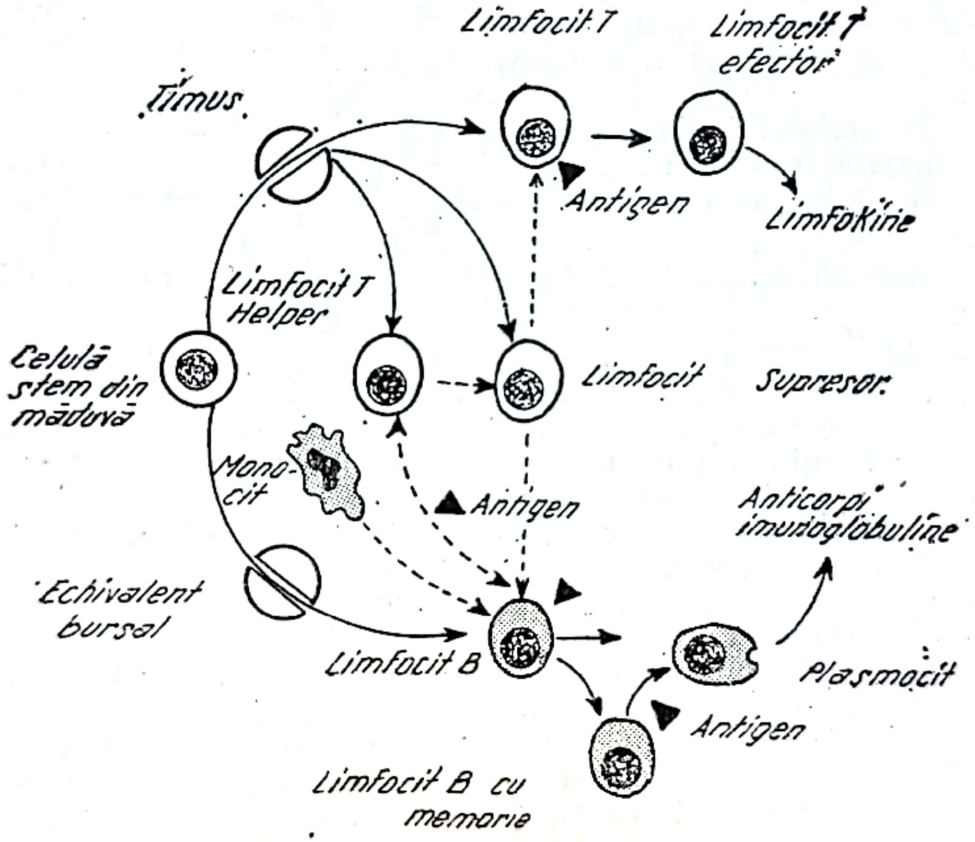


Fig. 7. 14. — Schema relațiilor limfocitului B și limfocitului T în generarea răspunsului imun.

Stimularea limfocitelor B determinată de prezența antigenilor este ajutată de o categorie de limfocite T numite *ajutătoare (helper)*, ca și de macrofage. Acestea din urmă captează antigenul pe suprafața lor și îl fac mai imunogen. Macrofagele pot chiar fagocita unii antigeni, pe care, după ce îi prelucrează în citoplasmă, în scopul sporirii puterii lor antigenice (de activare a limfocitelor), îi exocitează și îi cedează limfocitelor B.

Scanned with OKEN Scanner

Răspunsul imun secundar. La al doilea contact cu antigenul celulele memorizante îl recunosc și se transformă în imunoblaste mult mai rapid. Clonele ce iau naștere formează în mod diferențiat, pe de o parte, celule plasmocitare secretoare de imunoglobuline și pe de altă parte, celule cu memorie care să asigure linia limfocitară memorizantă gata de intervenție pentru un nou răspuns imun.

Principalele organe în care se formează imunoglobulinele de către limfocitele B sînt tubul digestiv, măduva hematogenă, medulara foliculilor limfatici, splina, mucoasa bronhiilor, cavitățile seroase, în special cea peritoneală.

După stimulare, imunoblastele trec în căile limfatice, apoi în sînge, pe care-l părăsesc spre a se localiza în apropierea focarului antigenic. De exemplu: imunoblastele ganglionilor limfatici mezenterici migrează preferențial în corionul mucoasei intestinale, în timp ce imunoblastele splinei rămîn în pulpa roșie sau migrează în măduva osoasă după imunizarea secundară.

Imunoglobulinele acționează în trei feluri: 1) prin atac direct asupra agentului invadant; 2) prin activarea complementului care atacă agentul invadator; 3) prin activarea sistemului anafilactic din jurul agentului patogen.

a) În *atacul direct* anticorpii acționează prin mai multe mecanisme:

— *aglutinare* — determină conglomerarea mai multor antigeni;

— *precipitare* — complexul antigen-anticorp devine insolubil și precipită;

— *neutralizare* — anticorpii acoperă toate pozițiile toxice ale agentului patogen;

— *liză* — atacă membrana celulară în mai multe puncte, care, prin rupere, duc la distrugerea agentului patogen.

b) Activarea complementului. Complementul este reprezentat printr-un număr de cel puțin 15 proteine plasmatice. Aceste proteine sînt activate de complexele antigen-anticorp, activare ce poate începe secvențial, de la C_1' la C_9', sau alternant, de la C_3' către C_1' și de la C_3' către C_9'. Enzimele activate ale complementului pot distruge agentul patogen prin *liză* (digeră porțiuni din membrana celulară); *opsonizare* și *fagocitoză* (atacă suprafața bacteriei sau antigenii, făcîndu-i mai susceptibili la fagocitoză), *acțiunea chemotripsinei* (unele proteine ale complementului sînt hemotrope), *aglutinare, neutralizare.*

c) Activarea sistemului anafilactic. Unii anticorpi, în special IgE, prin atașarea la suprafața bazofilelor și mastocitelor, produc, la contactul cu antigenul, degranularea cu eliberarea histaminei, heparinei, enzimelor lizozomale etc., ce dau reacții locale de tip anafilactic.

7.3.1.2.1.5. *Limfocitele T*, timodependente, prezintă la microscopul *scanning* (microscopul de baleiaj) foarte rari și mici microvili, cu puține poziții antigenice pe fața externă a membranei celulare (în număr de aproximativ 700) (fig. 7.15 și 7.16). Cele mai multe limfocite T umane au pe suprafața externă receptori pentru porțiunea Fc a IgG și a formei monomerice IgM. Limfocitele T de om pot fi recunoscute prin faptul că formează rozete cu eritrocitele de oaie. La șoarece, pe suprafața externă a limfocitelor T au fost identificate mai multe tipuri de antigeni: *antigenul Theta, antigenii TL (Thymus-leukemia), antigenii Lyt (Lymphocyte alloantigeni).* Pe baza ultimilor *(Lyt)* s-au putut defini subclasele de limfocite T: ajutătoare *(helper)*, supresoare, ucigașe *(killer).*

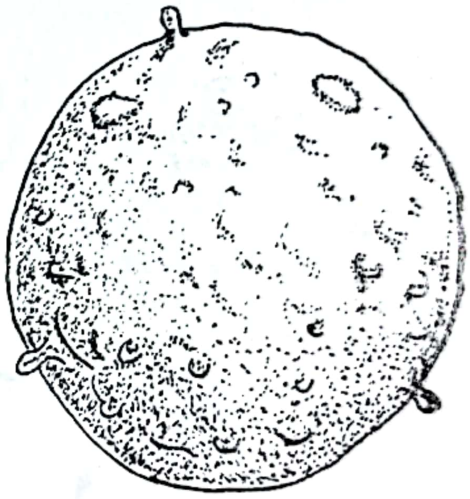
Scanned with OKEN Scanner

Limfocitele T sînt stimulate numai de anumiți antigeni și de unele substanțe mitogene nespecifice ca fitohemaglutinina și concavalina A.

Originea. Limfocitele T migrează în timus în timpul vieții fetale, din organele principale care dau naștere și limfocitelor B, progresiv din ficat, splină și apoi din măduva hematogenă. În timus, limfocitele se diferențiază diferit, după așezarea lor în corticala sau medulara lobulilor organului respectiv.

← *Fig. 7. 15.*—Membrana de suprafață a limfocitului T văzută la microscopul de *scanning.*

Fig. 7. 16. — Schema organizării suprafeței externe a limfocitului T (rari microvili).



Limfocitele din corticală, aproximativ 85% din totalul celulelor T, se divid rapid și sînt foarte sensibile la liză prin acțiunea corticosteroizilor. Ele conțin pe suprafață antigen HLA—A, HLA—B și HLA—H. Limfocitele T localizate în număr mai redus în medulara lobulilor timici sînt rezistente la cortizon, se divid lent și conțin pe suprafața externă puțini antigeni HLA—A, B și C.

Celulele-stem din măduva hematogenă intră întîi în cortexul timic, apoi în medulară. În drumul lor dinspre corticală spre medulară ele se diferențiază morfologic și funcțional. Primele timocite corticale, reprezentînd aproximativ 10% din totalul limfocitar circulant, au pe suprafață *marker*-ii T_{11}, T_{10} și T_9. Limfocitele diferențiate — aproximativ 80% din totalul limfocitar circulant — mențin *marker*-ii T_{11} și T_{10}, dar pierd *marker*-ul T_9, cîștigînd în schimb patru alți *marker*-i, respectiv T_8, T_6, T_4 și T_1. Pe măsură ce

Scanned with OKEN Scanner

se îndreaptă spre medulara timică, limfocitele se dezvoltă în două linii, care prezintă în comun *marker*-ii T_{11}, T_{10}, T_3 și T_1, cu deosebirea că o linie are în plus T_8 iar cealaltă, T_4.

Timocitele medulare răspund la stimularea cu mitogeni și aloantigeni. Ele pierd *marker*-ii T_{10} și apoi ambele linii celulare migrează înspre periferie în organele limfoide secundare. Drumul timocitelor de la măduvă la periferie durează aproximativ 3 zile, diferențierea lor fiind stimulată de substanțe secretate de celulele stromale ale timusului, de hormonii timici. Completa maturare a limfocitelor T este marcată de *recunoașterea antigenilor majori de histocompatibilitate*, la ai căror stimuli celulele T se activează declanșînd procesele de *imunitate celulară*.

În organele limfoide secundare celulele T rămîn în anumite zone ale acestora, numite zone timodependente. Migrarea limfocitelor T este specifică pentru fiecare organ limfoid secundar sau periferic. Această specificitate este determinată de anumite molecule prezente pe suprafața limfocitelor și pe suprafața celulelor endoteliale ale venulelor postcapilare. Recent, s-a demonstrat existența unor molecule cu greutate de aproximativ 80 000, care determină localizarea specifică a limfocitelor T în ganglionii limfatici.

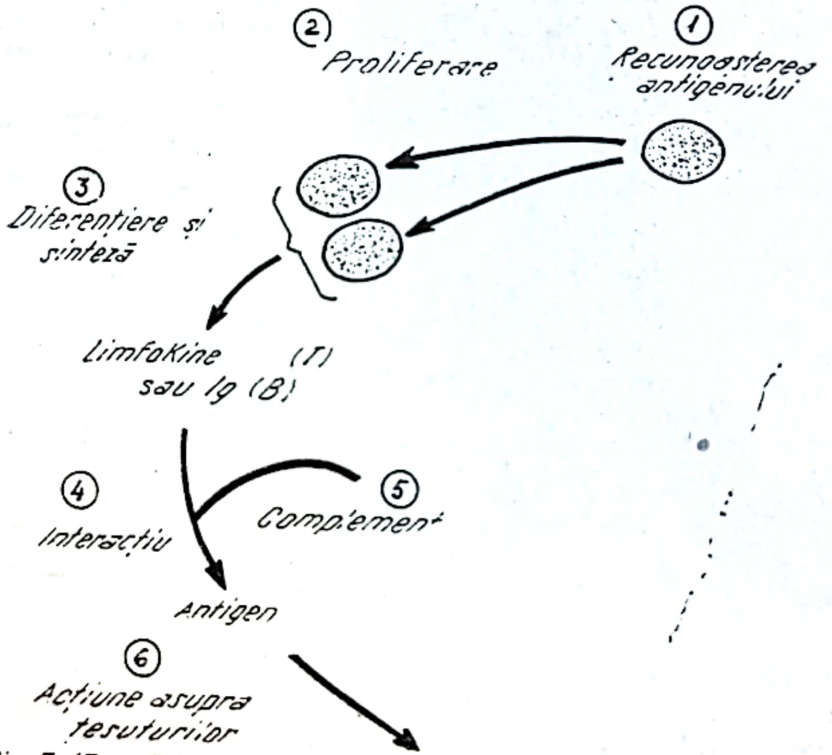


Fig. 7. 17. — Schema activării limfocitului T; secreția de limfokine.

Faptul a fost demonstrat prin anticorpi monoclonali care, blocînd moleculele respective, împiedică migrarea limfocitelor T în ganglionii limfatici, dar nu și în plăcile Peyer.

Limfocitele T sînt cele mai numeroase în sîngele periferic. Ele sînt activate de anumiți antigeni dar și de unele substanțe mitogene ca fitohemaglutinina și concavalina A (fig. 7.17). Interacțiunea dintre acestea și limfocitele T este un proces specific, care determină activarea celulelor T, ce vor *secreta limfokine*. În procesul de activare se formează *clone de celule T* (gene-

Scanned with OKEN Scanner

rație de celule cu aceleași caracteristici morfologice și funcționale). Din aceste noi celule clonale, unele limfocite T vor acționa prin secreție de limfokine, altele vor redeveni celule cu memorie, circulante.

Limfocitele T pot fi identificate prin:

— *rozetarea* cu eritrocite de oaie: limfocitele T formează spontan rozete cu eritrocitele de oaie;

— *histochimic*: limfocitele T se caracterizează printr-o activitate pozitivă a enzimei alfa-naftil-acetat-esteraza;

— *identificarea substratului de limfocite T* pe baza receptorilor de suprafață;

— *legarea virusului pojarului* de pe suprafața limfocitelor T. Acest receptor este comun cu receptorul pentru eritrocitele de oaie. Legarea virusului de suprafața limfocitelor T inhibă deci rozetarea;

— *anticorpi monoclonali*.

Limfocitele T sînt împărțite în mai multe subtipuri funcționale, și anume:

a) *Limfocite T reglatoare*: ajutătoare (*helper*) și supresoare. Ele recunosc antigenii de histocompatibilitate din complexul MHC II.

b) *Limfocitele T efectoare* sînt limfocitele T citolitice, citotoxice, ucigașe sau *killer*.

Limfocitele T ajutătoare (*helper*) sînt limfocite cu *marker* T_4; ele intervin ca stimulatoare ale activării limfocitelor la antigeni, în special a limfocitelor B dar și a limfocitelor T (fig. 7.18) .

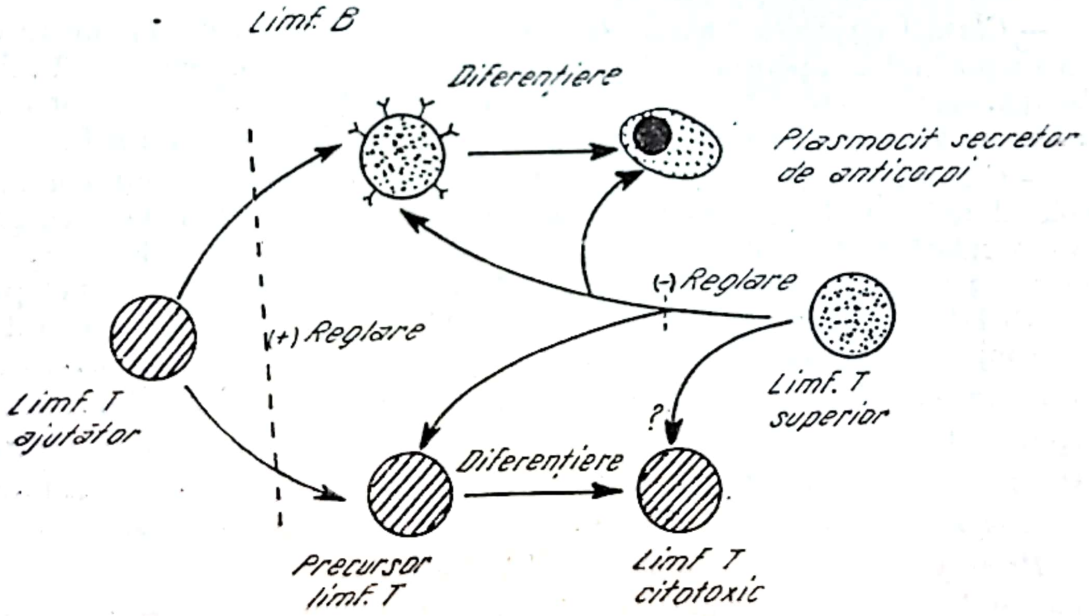


Fig. 7. 18. — Schema activității de reglare a limfocitului T ajutător *(helper)*.

Limfocitele T supresoare, sau limfocitele T cu *marker* T_8 previn activarea limfocitelor B și T la contractul cu antigenul, inhibînd diferențierea și proliferarea imunoblastelor (limfocite activate).

Limfocitele citolitice, citotoxice sau killer sînt limfocitele T cu *marker*-i T_8. Ele distrug celulele străine după ce au fost stimulate (activate) de către antigenii de pe suprafața acestor celule străine , în special de către antigenii complexului major de histocompatibilitate (MHC I). Limfocitele T citolitice

Scanned with OKEN Scanner

realizează *imunitatea celulară*, responsabilă de instaurarea hipersensibilității întîrziate, determină rejecția sau eliminarea alogrefelor, a celulelor tumorale. Sînt de asemenea responsabile de procesele de autoimunitate, de rezistența la unii agenți patogeni, de reacția Arthus. În declanșarea procesului imun, limfocitele T conlucrează cu macrofagele (detalii în capitolul „țesut conjunctiv" și „monocit sanguin").

c) *Limfocitele citolitice non-B sau timus-independente* reprezintă al treilea grup de limfocite. Din această categorie fac parte *celulele K* și *celulele NK*.

Limfocitele sau celulele K sînt capabile să lizeze celule ai căror antigeni de suprafață sînt complexați cu anticorpi IgG, deci să distrugă celule învelite cu imunoglobuline. Celulele K nu au proprietatea de fagocitoză, nu au imunoglobuline de suprafață ca limfocitele B. Originea lor este necunoscută. Se găsesc în număr mare în măduva osoasă și în splină, înainte ca aceste organe să fie populate de alte tipuri de limfocite. Splenectomia nu afectează numărul lor. La om își adaugă funcția citolitică la cea a celulelor efectoare.

Limfocitele sau celulele NK au capacitatea să distrugă unele celule-țintă, ai căror antigeni nu au fost aparent reținuți de sistemul imun. Numărul acestora celule-țintă este în general redus. Celulele NK distrug ușor celulele tumorale și celulele cultivate *in vitro*. Astfel, limfocitele NK par să realizeze o protecție a organismului împotriva celulelor canceroase.

Funcția limfocitelor T implică activarea celulelor prin antigenii specifici de pe suprafața altor celule, în special *antigenii de histocompatibilitate*, care sînt incluși în două clase majore:

— *Clasa I* (*complexul major de histocompatibilitate MHC I*) constă dintr-un singur lanț polipeptidic cu greutate de 45 000, asociați cu beta-2-microglobulina. Acești antigeni sînt prezenți pe suprafața tuturor celulelor nucleate. Din această clasă fac parte antigenii HLA-A, HLA-B și HLA-C.

— *Clasa II* (*antigenii de histocompatibilitate MHC II*) sînt complexe bimoleculare (lanț alfa cu greutate moleculară de 34 000 și lanț beta cu greutate moleculară de 21 000), prezente numai pe suprafața limfocitelor B, macrofagelor și pe suprafața limfocitelor T activate. Din această clasă fac parte antigenii HLA—DR. În general limfocitele T cu *marker* T_4 recunosc antigenii în conjuncție cu MHC II iar limfocitele T cu *marker*-i T_8 recunosc antigenii în conjuncție cu MHC I. Recent s-a arătat că receptorii limfocitelor T pentru antigeni sînt heterodimeri legați disulfidic și că un heterodimer este codificat de trei gene omoloage diferite (regiunea V, variabilă; J; și C — constantă).

Limfocitele T secretă limfokine sau, în unele cazuri, *interleukine*.

Principalele limfokine sintetizate de limfocitele T

— Factorul de inhibare a migrării	— inhibă migrarea macrofagelor;
— Factorul de inhibare leucocitar	— inhibă migrarea neutrofilelor;
— Factorul de activare a macrofagelor	— stimulează activitatea citolitică a macrofagelor;
— Interferoni gamma	— stimulează activitatea citolitică a macrofagelor;
— Factorul de stimulare a formării coloniilor	— stimulează creșterea și diferențierea monocitelor în macrofage;

Scanned with OKEN Scanner

— Factorul de activare a fibroblastelor	— stimulează proliferarea fibroblastelor;
— Interleukina-2, cunoscută în trecut ca factor de creştere a limfocitelor T	— stimulează creşterea şi activarea limfocitelor T;
— Interleukina-3	— stimulează creşterea şi diferenţierea monocitelor;
— Factorul de creştere a limfocitelor B	— stimulează creşterea şi diferenţierea limfocitelor B.

7.3.1.2.2. Monocitul (Monocytus)

Monocitele se găsesc în sîngele periferic în proporţie de 6—8% de elemente albe. Creşterea numărului (*monocitoză*), ca şi scăderea numărului de monocite (*monocitopenie*) însoţesc bolile sanguine sau unele boli generale ale organismului.

7.3.1.2.2.1. *Forma celulei* este rotunjită iar *diametrul* de 30—40 μm (monocitul mare) şi 20—30 μm (monocitul mic).

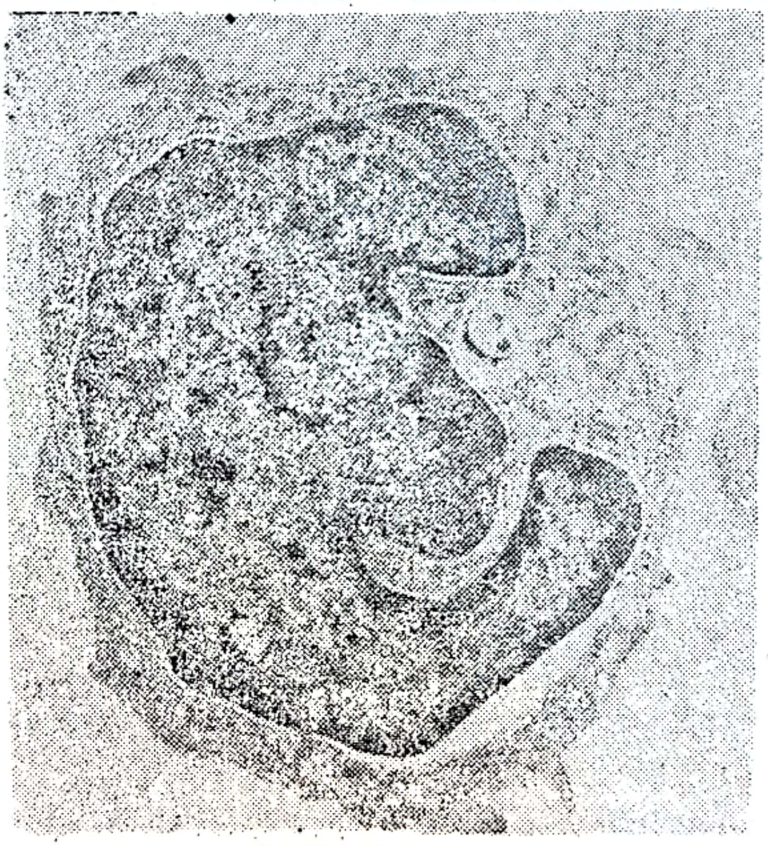


Fig. 7.19. — Monocit (imagine electronooptică × 15 600).

7.3.1.2.2.2. *Structura şi ultrastructura monocitului*

Nucleul celulei, nesegmentat, apare adeseori reniform. Cromatina are un aranjament mai particular, asemănător cu o tablă de şah, în care heterocromatina reprezintă zonele întunecate iar eucromatina, zonele clare. La microscopul electronic se observă şi prezenţa unui nucleol (fig. 7.19 şi planşa 7.4).

Scanned with OKEN Scanner

Citoplasma este abundentă, bazofilă, se colorează în albastru-cenușiu ca cerul înainte de furtună. În citoplasmă se găsesc organite celulare relativ abundente, granule azurofile (lizozomi) concentrate în scobitura nucleului, ribozomi și polizomi, reticul endoplasmic rugos slab dezvoltat, mitocondrii mici alungite; complexul Golgi este bine dezvoltat, microtubulii și microfilamentele sînt numeroase. În citoplasmă mai apar frecvent și resturi celulare pe cale de dezintegrare.

Membrana celulară este lipoproteică, mozaicată în strat bine reprezentat de glicoproteine la exterior. Ea prezintă numeroase microvilozități, vezicule de pinocitoză și de micropinocitoză. Membrana emite frecvent pseudopode prin care monocitul se deplasează în afara vasului, dar mai încet decît granulocitul. Membrana monocitului, ca și a macrofagului, forma sa activă, conține receptori pentru IgG (subclasele IgG_1 și IgG_3) și pentru C_3' (fig. 7.20).

Originea. Monocitele se formează în principal în măduva roșie hematogenă. În număr redus se pot forma la om, după unele păreri, și în organele limfopoietice. Durata de viață în sîngele circulant diferă de la un individ la altul sau de la o specie la alta. Ea se situează la om între 20 și 60 ore. Celulele părăsesc patul sanguin în orice moment de viață a lor, mult mai repede însă în inflamații. În țesuturi, monocitele se transformă în *macrofage* sau *histiocite active*

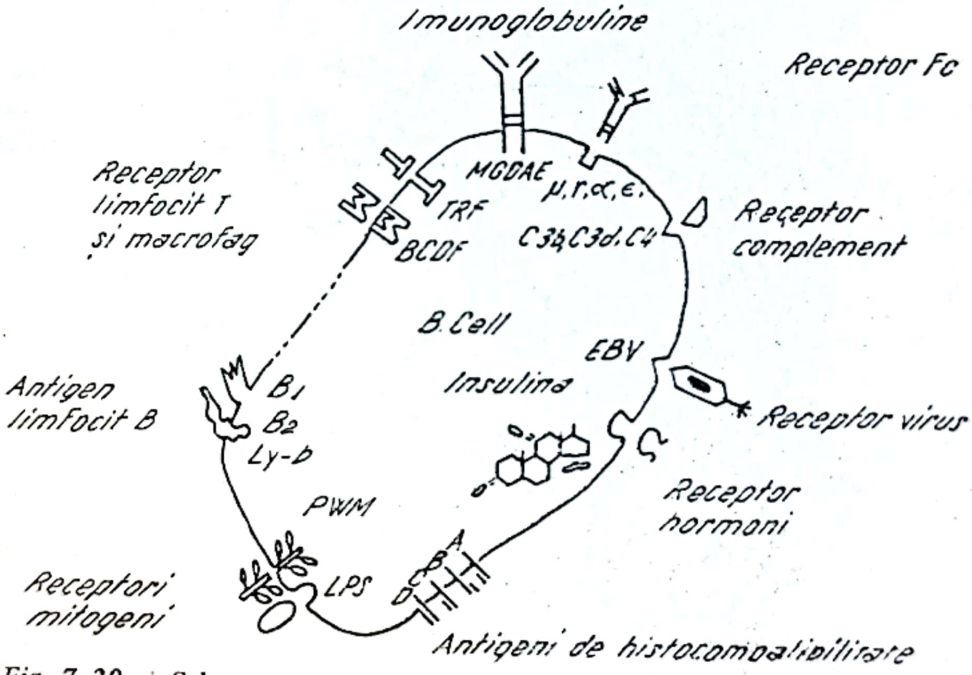


Fig. 7. 20. — Schema macrofagului activ cu indicarea receptorilor de pe suprafața sa externă.

ce realizează în totalitate sistemul macrofag al organismului (fig. 7.21). În procesul transformării, la nivelul celulelor apar modificări morfologice, metabolice de conținut enzimatic și granular. Macrofagul sau histiocitul poate avea în țesuturi o viață lungă, pînă la aproximativ 75 de zile. Macrofagele îmbătrînite sau distruse sînt eliminate prin fagocitoză, desfășurată de celelalte macrofage active. Există și pentru chemotaxia macrofagelor factori umorali mediatori, dar mai puțin cunoscuți decît pentru granulocite. Aceștia sînt reprezen-

Scanned with OKEN Scanner

taţi prin IgG, C'_{5a}, sau prin molecule eliberate de limfocitele T (limfokine). Se presupune de asemenea că procesul de opsonizare a macrofagelor se desfăşoară asemănător cu cel al neutrofilelor (fig. 7.22).

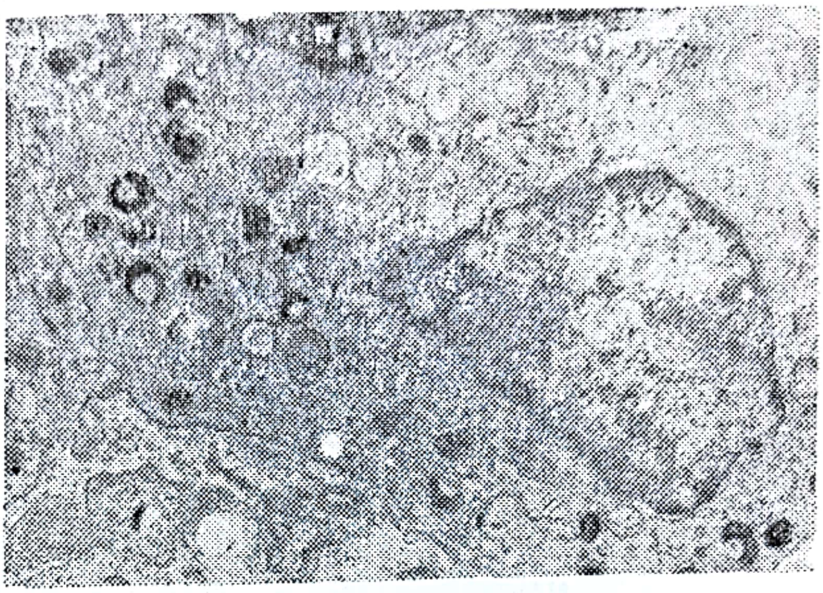


Fig. 7. 21. — Monocit transformat, în ţesuturi, în macrofag (imagine la microscopul electronic ×21 000).

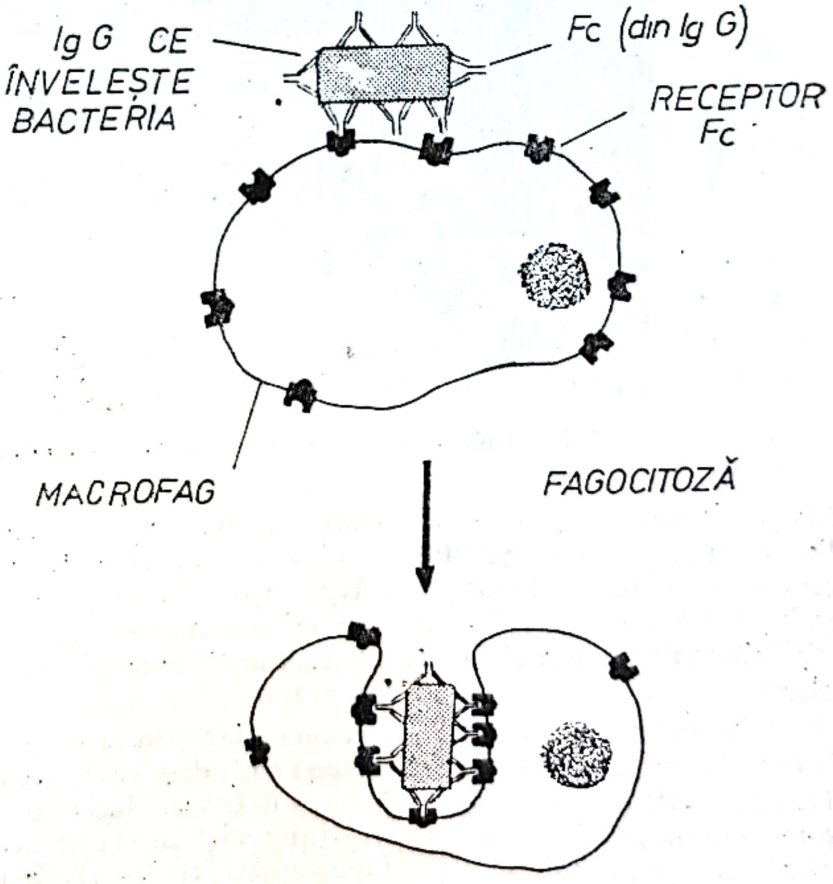


Fig. 7. 22. — Fagocitoza în macrofag.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.1.2.2.3. *Funcțiile monocitului.* Monocitele, respectiv macrofagele din țesuturi, fagocitează în general particule de talie mare cum ar fi bacteriile, virusurile, complexele antigen-anticorp, corpurile străine anorganice (fier, siliciu, beriliu, plutoniu, praf) și celule întregi sau resturi celulare (eritrocite).

Macrofagele fagocitează bacteriile mai încet decît neutrofilele, dar sînt mai eficiente în distrugerea lor, folosind în principal căile metabolice dependente de oxigen (fosforilarea oxidativă). Pe măsură ce macrofagul se maturizează, în citoplasmă crește și numărul de lizozomi ce conțin fosfataza acidă, beta-glucuronidază, lizozim, hialuronidază și alte hidrolaze acide (fig. 7.23).

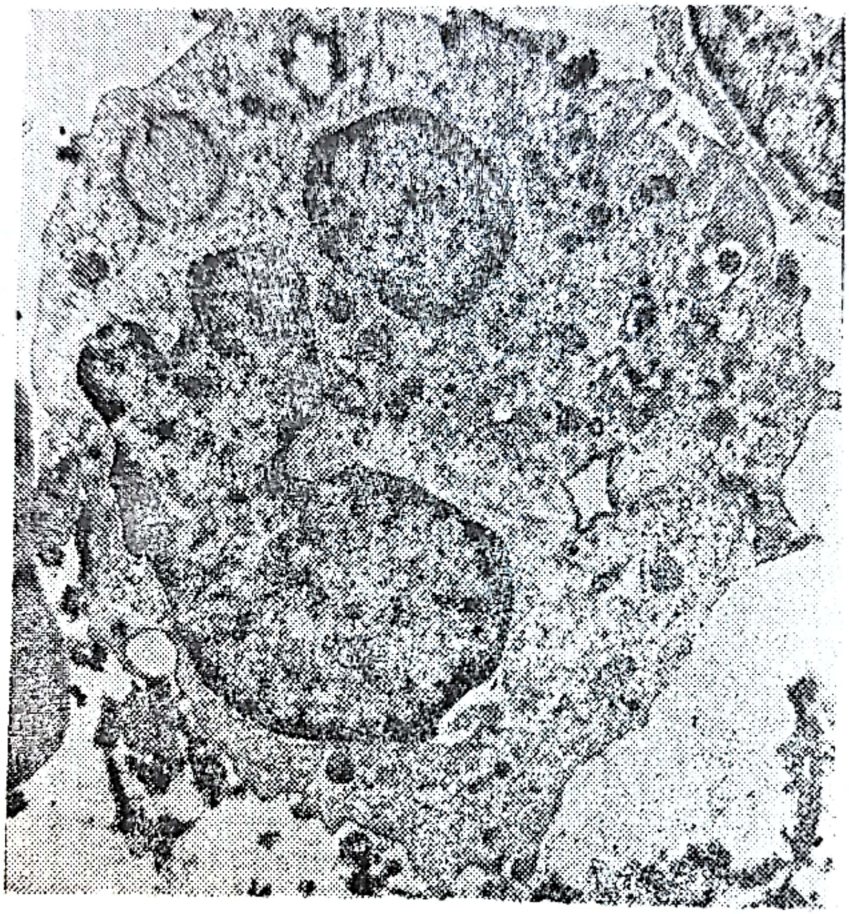


Fig. 7. 23. — Macrofag activ (imagine electronooptică × 25 200).

Acești lizozomi par să aibă un rol digestiv mai degrabă decît bactericid. De aceea se pare că macrofagele folosesc, pentru distrugerea particulelor endocitate, un sistem generator de H_2O_2, iar catalaza, care înlocuiește mieloperoxidaza din stadiile celulare monocitare imature, va interveni asupra substratelor în prezența H_2O_2; la fel și peroxidarea lipidică din macrofagele alveolare.

În funcție de condițiile intracelulare, microorganismele fagocitate pot fi omorîte și digerate, sau omorîte și slab degradate, sau sechestrate în celulă. În acest ultim caz se situează bacilul tuberculozei, bacilul leprei, *Legionella pneumophila*, rickettsiile — care sînt rezistenți la enzimele lizozomale și care rămîn în citoplasmă în afara fagozomilor, fie liberi, fie localizați pe alte organite cum ar fi pe ribozomi, înconjurîndu-se apoi cu o endomembrană.

Scanned with OKEN Scanner

Un grup particular de macrofage este reprezentat de celulele ce fagocitează eritrocite. Aceste macrofage se întîlnesc în principal în insulele eritroblastice ale măduvei hematogene, în splină și în ficat.

Eritrofagocitoza este urmată imediat în citoplasma macrofagului de divizarea eritrocitelor în fragmente mici, sferice, urmată de hemoliză cu umflarea bruscă a vacuolei de digestie. Fagozomul crește mult în volum, apoi se contractă. Fragmentele de hematie se plisează formînd mase compacte la care aderă lizozomi. Apar astfel lizozomi secundari, ce conțin produsele de digestie a eritrocitelor sub forme mielinice, molecule de feritină și alte resturi care treptat pot dispărea. Uneori macrofagul poate expulza reziduuri ale digestiei.

Unele macrofage se încarcă cu granule pigmentare galbene ce conțin fier, respectiv *hemosiderina* (reacția Perl pozitivă pentru fier), care rămîne după fagocitarea și digestia eritrocitelor. În unele macrofage pot apărea siderozomi și de origine externă, printr-o supradozare feruginoasă în organism, sau pot apărea — în mod patologic — în număr mare, în hemocromatoză.

Un alt grup de macrofage, așa cum se observă în *ganglionul limfatic inflamat*, fagocitează limfocite și limfoblaste; sau același macrofag poate fagocita, pe lîngă limfocite, plasmocite, chiar eritrocite și granulocite. Aceste macrofage au fost numite de patologi *„celulele Flemming"*.

În boli ereditare, familiale, așa-numitele *tezaurismoze*, apar macrofage cu material endocitat, incomplet digerat, ceea ce antrenează o acumulare de glicolipide, de muco- și oligozaharide, în funcție de deficitul enzimatic lizozomal; de exemplu: boala Gaucher, Niemann-Pick etc.

Funcția secretorie a macrofagelor. Celulele sintetizează și pot secreta în jurul lor unele substanțe ca hidrolaze acide, lizozim, proteaze neutre, prostaglandine, componente ale complementului și ale properdinei, agenți reglatori ai creșterii fibroblastelor, reglatori ai angiogenezei, stimulatori ai celulelor-stem medulare, interferoni, substanțe ce reglează coagularea sanguină.

Interacțiunea macrofag-limfocit în producerea *imunității mediate celular* duce la dobîndirea de către organism a unei funcții crescute antimicrobiene, cu creșterea rezistenței la infecții și a activității antitumorale (fig. 7.24). Activarea macrofagelor în acest sens este determinată de factori solubili (limfokine secretate de limfocitele T). Din limfocitele ce stimulează macrofagele, factorul MIF *(macrophage inhibitor factor)* determină localizarea celulelor la locul de invazie microbiană, inhibînd deplasarea lor în alte zone. De asemenea, unele limfokine activează funcția endocitară și capacitatea bactericidă a macrofagelor. Mecanismul prin care aceste limfokine, care sînt probabil gamma-interferoni, cresc puterea de distrugere a microbilor de către macrofage, este însă neclarificat (fig. 7.25).

Macrofagele pot prezenta caracteristici în funcție de organul în care se află. Astfel *macrofagele peritoneale* sînt considerate ca celule libere tipice față de cele existente în alte organe. Ele desfășoară în principal metabolismul glicolitic. *Macrofagele ficatului*, respectiv *celulele Kupffer*, nu se divid atunci cînd sînt în inactivitate; unele dintre ele pot realiza aceasta după ce sînt stimulate de diferiți factori chimici sau infecțioși. *Macrofagele pulmonare* au rol important în apărarea împotriva prafurilor inhalate. Ele sînt localizate în special la interfața aer-țesut și pot fi ușor examinate la om în urma recol-

Scanned with OKEN Scanner

tării prin tehnica de lavaj bronhopulmonar. Ele se formează în măduva hematogenă, dar în număr mic se pot divide și local. *Macrofagele alveolare* conțin o cantitate crescută de lizozim, endocitat în parte din secrețiile căilor respi-

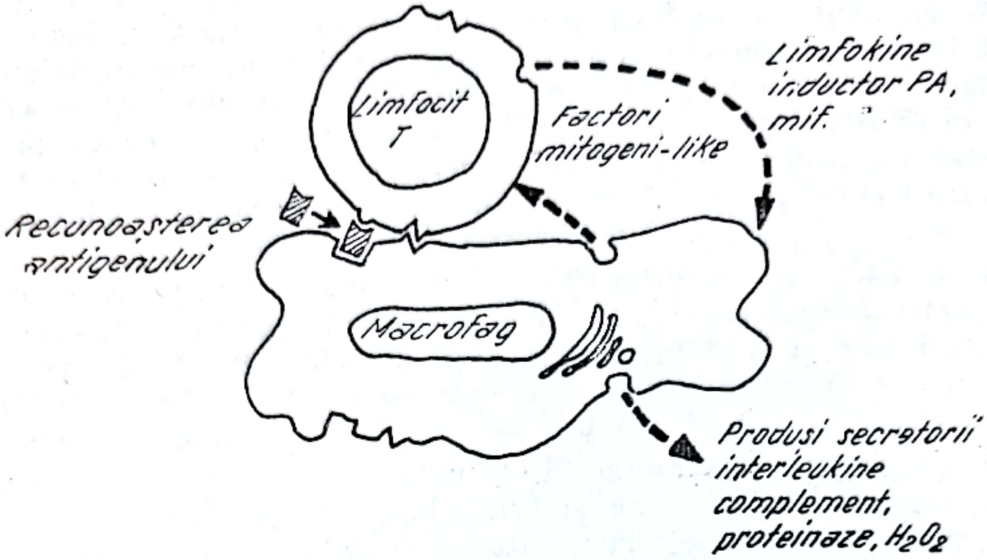


Fig. 7. 24. — Interacțiunea macrofag-limfocit T.

ratorii. Ele desfășoară în principal metabolismul aerob. În plămînul uman, macrofagele alveolare sînt de trei tipuri: *tipul A*, 94—98%, este alcătuit din celule cu diametrul de 25 μm, cu o citoplasmă întunecată ce conține granule albastru-închis, adeseori vacuole și uneori eritrocite ingerate. *Tipul B*, 5%, cuprinde celule cu diametrul de 30 μm, avînd un nucleu mai mic dar cu nucleoli proeminenți. *Tipul C*, 1%, este reprezentat de celule mari, de 40 μm în diametru și citoplasma încărcată de vacuole. Numărul lor crește în pneumonia lipoidă.

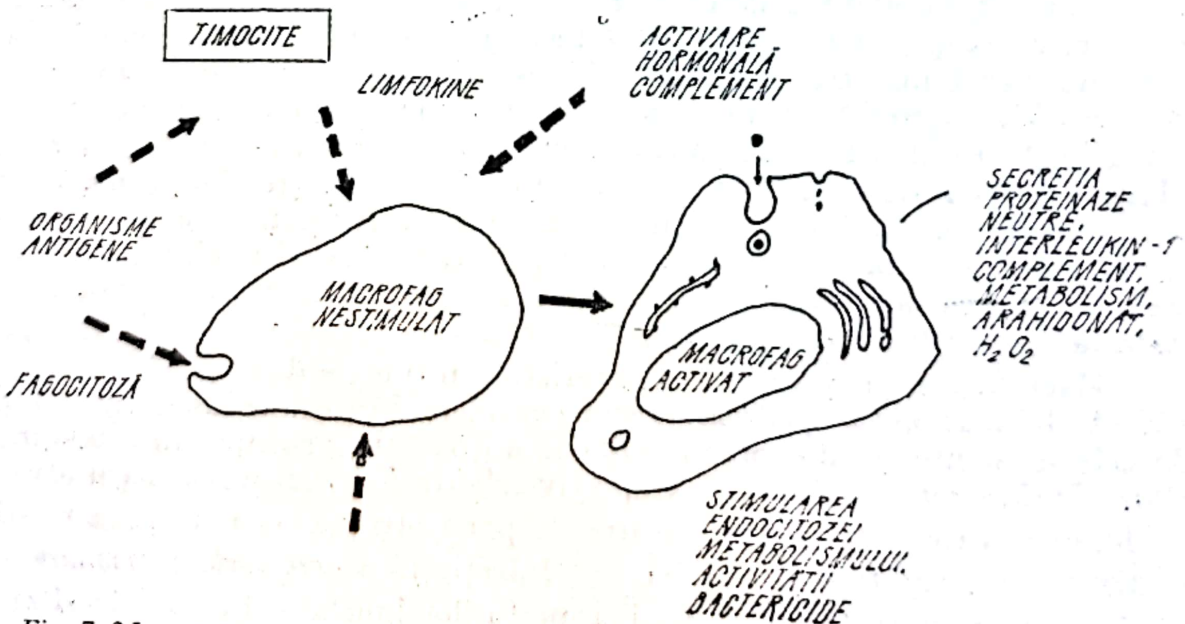


Fig. 7. 25. — Schema stimulării activității macrofagului prin antigene, limfokine, hormoni, complement și alte particule fagocitate.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.2. ERITROCITUL = HEMATIA (ERYTHROCYTUS)

Număr. În sîngele periferic, hematiile se găsesc în număr de aproximativ 5 milioane pe mm³ la bărbaţi şi 4,5 milioane pe mm³ la femei. Numărul eritrocitelor diferă uşor de la un individ la altul, dar poate prezenta mari variaţii în plus sau în minus în caz de boli. Poliglobulia fiziologică se întîlneşte la nou-născut, în valoare de 6—7 milioane pe mm³. Cifra scade repede după naştere şi ajunge la numărul existent la adult. De asemenea după efort prelungit, la sportivi, la altitudine ridicată, numărul de eritrocite criculante se măreşte. Scăderea fiziologică a numărului de hematii se întîlneşte la bătrîni. Patologic, creşterea (*poliglobulia*), ca şi scăderea (*anemia*) numărului de eritrocite se observă, de obicei în boli ale sîngelui sau în alte maladii ale organismului.

Diametrul eritrocitului la om este de aproximativ 7,2 μm, la celula uscată, sau de 8,6 μm la hematia proaspătă, circulantă. Variaţii ale diametrului hematiei apar în raport cu specia (exemplu: eritrocitul iepurelui are diametrul de 5,7 μm) sau la acelaşi individ, în raport cu anumite condiţii fiziologice sau patologice. Creşterea diametrului hematiei determină apariţia *macrocitelor;* cînd diametrul depăşeşte 10 μm, vorbim de *megalocite* (acestea apar de obicei în boli sanguine — anemii). Scăderea diametrului eritrocitului sub 7 μm determină apariţia în sînge a *microcitelor.* Variaţiile de diametru eritrocitar poartă denumirea de *anizocitoză.*

Fragilitatea eritrocitelor. În mediu cu concentraţii diferite hematia se comportă caracteristic. Astfel în mediul hipotonic eritrocitul se umflă, se balonizează, iar conţinutul lui iese în afara celulei, proces numit *hemoliză.* Există susceptibilităţi diferite la hemoliză, eritrocitele prezentînd fragilitate variată în mediul hipotonic. Din eritrocit rămîne membrana celulară, ce păstrează forma celulei, realizînd hematia-fantomă. Prin acest procedeu s-a studiat mult morfologia şi fiziologia plasmalemală. Hemoliza hematiei poate fi determinată şi de solvenţi lipidici, venin de şarpe şi alţi agenţi chimici sau fizici. În mediul hipertonic, hematia se zbîrceşte, se ratatinează, pe suprafaţa ei apar ţepi. Aspectul eritrocitului devine asemănător echinocitului sau unei castane cu ţepi. Eritrocitele se pot agrega în *rulouri* sau fişicuri care sînt realizate probabil prin modificări ale suprafeţei celulare. Ele prezintă şi un grad de *flexibilitate* ce-i permite reducerea diametrului în capilarele mici, cu lumenul sub 7 μm.

7.3.2.1. Forma eritrocitului

În mod normal, în sîngele periferic forma cea mai frecventă este de celulă rotunjită, văzută din faţă, şi de disc biconcav, văzută din profil *(discocit),* datorită faptului că celula are partea centrală mai subţire, în timp ce ectoplasma prezintă o grosime mai mare. Modificările reversibile şi ireversibile ale formei eritrocitului poartă denumirea de *poikilocitoză.*

7.3.2.1.1. Forme de eritrocite

— *Sferocitele* sînt eritrocite rotunde, de forma unui balon sau unei sfere;
— *echinocitele* sînt hematii de formă sferică ce prezintă pe suprafaţa lor prelungiri de dimensiuni egale (ţepi, spiculi), în număr de aproximativ 20—

Scanned with OKEN Scanner

30, localizate echidistant. Astfel de forme eritrocitare apar atunci cînd concentrația moleculelor de ATP scade în celulă și în mediul extracelular. Revenirea la normal a moleculelor de ATP duce la transformarea echinocitului în discocit. Echinocitele apar și ca forme ireversibile la celulele îmbătrînite sau în boli sanguine;

— *eliptocitele*, eritrocite ovale, se găsesc în mod normal în sînge în proporție de 10—15% din globulele roșii. Ele apar însă în procent de 90 în eritrocitoza ereditară. Pot fi întîlnite și în alte boli sanguine;

— *stomatocitele* sînt forme de hematii rotunde ce prezintă într-o anumită zonă o înfundătură ca o gură (stoma). Stomatocitele apar la un pH ușor scăzut sub 7. Revenirea la normal a pH-ului plasmei sanguine duce la retransformarea stomatocitelor în discocite. Forme ireversibile de stomatocite apar în unele boli ale sîngelui, în special în hemoglobinopatii (fig. 7.26);

— *acantocitele* sînt hematii de obicei de formă rotunjită ce prezintă pe suprafața lor 5—15 prelungiri, de dimensiuni inegale și situate la distanțe inegale între ele. Membrana celulară a acantocitelor este deficitară în lecitină. Ele apar în ciroze și în anorexia nervoasă, fiind numite și *spurr cells*;

— *drepanocitele* reprezintă hematii modificate, în formă de corn sau seceră. Se găsesc în special în hemoglobinopatii;

— *leptocitele*, sau eritrocitele plate, au centrul ce nu se colorează. Se întîlnesc în hemoglobinopatii, în special în HbS, HbC și HbE, în talasemie și în deficit de fier în organism.

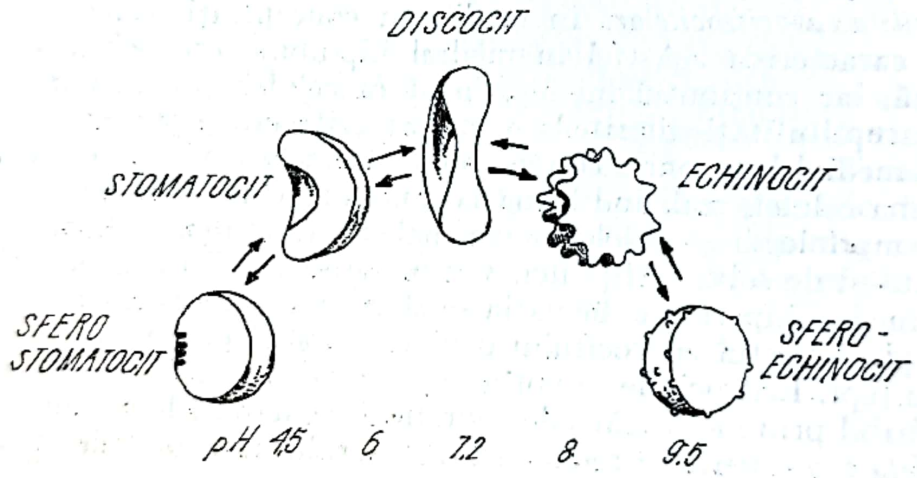


Fig. 7. 26. — Modificările formei eritrocitului în funcție de pH.

În general acantocitele și drepanocitele sînt forme patologice ireversibile ale hematiei.

Culoarea eritrocitelor se poate modifica, celulele apărînd fie palide *(hipocromie)* în anemii, fie diferit colorate *(anizocromie)* în tulburări ale eritropoiezei.

7.3.2.2. Structura și ultrastructura eritrocitului

Hematia adultă la om este o celulă *anucleată*. În timpul diferențierii, eritrocitul a pierdut nucleul prin extruzie în mediul extracelular, unde este fagocitat de către macrofage, și a pierdut de asemenea și organitele celulare. În citosol rămîn doar rari microtubuli și microfilamente ancorate de membrana celulară. Pe lîngă acestea, în rare hematii mai pot rămîne resturi de

Scanned with OKEN Scanner

nucleu. Astfel poate persista invelișul nuclear, care realizează un inel în interiorul celulei *(inel Cabot)*. În altele pot rămîne numai cîțiva grunji de cromatină dispersați în citosol care alcătuiesc *corpii Jolly*.

Eritrocitul din sîngele periferic este format din citoplasmă și membrană celulară. *Citoplasma*, amorfă sau fin granulară la examenul electrono-optic, prezintă un citoschelet destul de bine reprezentat prin microfilamente și tubuli. În citosol se găsesc în principal macromolecule proteice structurale și protein-enzime. Dintre acestea din urmă sînt prezente în principal enzime ale căii glicolitice anaerobe (lactatdehidrogenaza), ale șuntului hexozo-monofosfat (glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza și 6-fosfo-gluconat-dehidrogenaza), precum și alte enzime cum ar fi carboanhidraza, catalaza etc. Tot în citosol se găsesc în cantități mici lipide, vitamine, mai ales din grupul B (B_6, B_{12}, acid folic). În principal, în citosol se găsește hemoglobina.

Hemoglobina (Hb) reprezintă în eritrocitul circulant 33% din cele 40 de procente de parte solidă a celulei (hematia este formată din 60% apă și 40% părți solide). Molecula de Hb este formată dintr-un grup *hem* (derivat din porfirină ce conține fier), legat de o porțiune proteică numită *globina*. După tipul de lanț polipeptidic atașat hemului, hemoglobina din eritrocitul normal poate fi de mai multe tipuri:

— HbA_1 predomină la adult și reprezintă 97% din totalul hemoglobinei eritrocitului. Globina este formată din două lanțuri alfa și două lanțuri beta;

— HbA_2 se găsește în cantitate mai mică, cca 2%, avînd globina formată din două lanțuri alfa și două lanțuri delta;

— *HbF* se găsește în cantitate extrem de redusă la adult — 1% — , dar predomină în eritrocitul nou-născutului și al copilului (pînă la 80%). Partea sa proteică, globina, este formată din două lanțuri alfa și două lanțuri gamma;

— *HbAIc* se găsește în cantități foarte mici. Molecula are o glucoză atașată la valina terminală a fiecărui lanț polipeptidic beta. Cantitatea ei crește în diabetul zaharat.

În sîngele normal hemoglobina se găsește în proporție de 16 g/l la bărbat și de 14 g/l la femeie. În fiecare oră se distruge și se reface aproximativ 0,3 g hemoglobină. După fagocitarea eritrocitelor îmbătrînite, Hb se desface în globină și hem. Globina este descompusă în aminoacizii componenți iar hemul este convertit în ficat în biliverdină iar aceasta — în bilirubină care va fi eliberată prin bilă.

Hemoglobina se formează în trei etape: în prima se sintetizează globina, în a doua se sintetizează porfirina care, în a treia etapă, se cuplează cu fierul pentru a realiza hemul. De aceea tulburările ce vor surveni în formarea hemoglobinei se referă la cele trei momente-cheie sau numai la sinteza proteică totală, globină și porfirină.

Sinteza globinei are loc, ca a oricărei alte proteine, la nivelul ribozomilor. Secvența aminoacizilor realizează două lanțuri polipeptidice — alfa și beta. Lanțul polipeptidic alfa din globină se termină cu valina, în timp ce lanțul polipeptidic beta are la capătul final valina și leucina. În cazuri patologice sau în maladii genetice congenitale pot apărea alterări ale secvenței aminoacizilor atît în lanțul alfa cît și în lanțul beta, ceea ce duce la formarea de hemoglobină patologică — de exemplu HbS, în care acidul glutamic de la poziția 7 a lanțului beta este înlocuit prin valină; HbC, în care acidul glutamic de la poziția 7 a lanțului beta este înlocuit cu lizină; HbG, în care la

Scanned with OKEN Scanner

poziția 7 a lanțului beta apare glicina în loc de acid glutamic; HbE în care acidul glutanic de la poziția 26 a lanțului beta este înlocuit cu lizină. Există înlocuiri de aminoacizi și în lanțurile alfa ale globinei, cu apariția HbI, în care lizina din poziția 17 este înlocuită cu acid glutamic. Alterări concomitente în lanțurile alfa și în lanțurile beta mai puțin cunoscute duc la formarea de HbB.

S-a observat de asemenea o predominanță a uneia sau alteia din formele hemoglobinice deviate de la starea normală, în raport cu diferite zone de pe glob. Astfel HbS și HbC apar frecvent în Africa, dar și regional în Italia, Grecia, India (mai mult de 30% din populație); HbC — în Ghana, HbE în Thailanda și alte zone din Asia de Est. Toate aceste alterări produc forme diferite de anemii, dintre care cea mai bine cunoscută este anemia drepanocitară, în care sîngele conține multe drepanocite. Indivizii cu drepanocizotă au 30—40% HbS și 60—70% HbA.

Tulburări genetice în producerea unui singur lanț polipeptidic din globină, prin diminuarea sau inhibarea sintezei proteice (nu calitativă, ca în hemoglobinopatii, ci cantitativă), determină apariția bolii ereditare numită *talasemia*, ce se poate manifesta de obicei ca anemie hemolitică hipocromă. Boala se întîlnește mai ales la populațiile din jurul Mediteranei. Cel mai frecvent defect apare în lanțul beta al globinei, mai puțin în lanțul alfa, delta și se pare că, în aceste condiții, ARN-ul mesager este cantitativ deficitar. În consecință, echilibrul globină-hem este modificat în talasemie prin scăderea cantității de globină sintetizată și formarea normală a hemului, care însă nu poate fi folosit, așa că excesul lui se distruge prin bilirubină putînd produce icter hemolitic. Talasemia este o boală ereditară provocată de o mutație ce apare la nivelul genelor ce sintetizează globina. Boala se poate transmite prin gene recesive autosomale. Talasemia este forma de anemie hemolitică cea mai des întîlnită în cazul hemoglobinopatiilor. Ea apare fie ca *talasemia major*, formă gravă de anemie hemolitică cu mortalitate în copilărie, fie ca *talasemia minor*, mai puțin severă, compatibilă cu viața individului, iar după pubertate prezentîndu-se ca anemie hipocromă microcitară cu poikilocitoză, hematii în țintă, hipersideremie.

Membrana eritrocitului a constituit obiect de cercetare intensă datorită faptului că, prin procesul de hemoliză eritrocitară în mediu hipoton, aceasta rămîne în forma sa inițială conservînd atît organizarea cît și cea mai mare parte a funcțiilor sale. *Hematia-fantomă* rezultată în urma hemolizei este golită de conținutul citoplasmatic și reprezentată doar de membrana celulară ce păstrează și forma celulei. Membrana eritrocitului este organizată după tipul unitar de membrane celulare, dintr-un strat bilipidic, ce formează continuum-ul lipidic, în care se intercalează proteinele în strat discontinuu dînd imaginea de mozaic lipoproteic. După situația lor în membrană, unele proteine sînt denumite *proteine integrale*, deoarece sînt incluse în continuum-ul lipidic, altele *proteine periferice*, situate la suprafața externă și internă a membranei, nefiind intercalate în stratul bilipidic. În membrana eritrocitului proteinele reprezintă aproximativ 50% și lipidele 42—43%. La acestea se adaugă un procent de 7—8 hidrați de carbon.

Lipidele din membrana eritrocitului reprezintă în total 500×10^{-10} mg/celulă, din care 30% lipide neutre, 60% fosfolipide și 10% glicolipide. Colesterolul este principalul component din grupul lipidelor neutre membranare fiind reprezentat în concentrație de aproximativ $1{,}25 \times 10^{-10}$ mg/celulă. El se

Scanned with OKEN Scanner

găsește mai mult sub formă liberă decît esterificată. Colesterolul liber, neesterificat în membrana hematiei, se află într-o dinamică continuă, fiind repede mobilizat între eritrocit și plasma sanguină. Procesul se desfășoară neenzimatic, fără consum de energie și fără modificarea conținutului sterolic din membrana eritrocitului. Schimburile se efectuează mai repede în anumite sectoare ale membranei hematiei și mai slab în altele, aceasta datorîndu-se probabil unei distribuții ușor inegale a colesterolului pe membrana celulară eritrocitară sau naturii fosfolipidului învecinat. Colesterolul esterificat se află în cantitate redusă în membrana hematiei și nu intră în schimburile cu plasma sanguină. Conținutul în colesterol poate crește în membrana eritrocitară în urma unei diete bogate în colesterol.

Fosfolipidele din membrana hematiei sînt reprezentate prin fosfatidilcolină în proporție de aproximativ $0{,}86 \times 10^{-10}$ mg/celulă, fosfatidil-etanolamină în proporție de $0{,}85 \times 10^{-10}$ mg/celulă, sfingomielină în proporție de aproximativ $0{,}77 \times 10^{-10}$ mg/celulă. O parte din fosfolipidele membranare ale hematiei pot fi schimbate cu fosfolipidele plasmatice. Astfel la om, 60% din lecitină și 30% din sfingomielină se găsesc în schimburi cu plasma, totalul lor din membrană fiind complet înlocuit în aproximativ 5 zile. Există însă și un depozit eritrocitar de fosfolipide ce nu intră în schimburi cu plasma sanguină.

Membrana hematiei conține și unele *enzime* implicate în metabolismul lipidelor constituente ca: *fosfolipaza A*, care transformă monoacilfosfogliceridele în compuși diacilați și *lizofosfolipaza*, care acționează asupra lizolecitinei.

Cantitatea de lipide din membrana hematiei se poate modifica în raport cu dieta alimentară, cu vîrsta celulei (scade concomitent cu îmbătrînirea ei), cu vîrsta individului, în diferite stări patologice sanguine sau generale. În stările patologice, pe lîngă modificarea cantitativă lipidică, în mebrană apar frecvent și raporturi anormale în compoziția lipidelor. Astfel în lipsa sau activitatea scăzută a enzimei lecitin-colesterolaciltransferaza plasmatică, eritrocitele prezintă o concentrație crescută de colesterol, nu și de lipide. În alte situații, cum ar fi cele observate la pacienții cu abetalipoproteinemie plasmatică, membrana numeroaselor acantocite conține un procent ridicat de colesterol și unul scăzut de fosfolipide, în care raportul lecitină/sfingomielină/fosfatidilserină apare modificat, în sensul scăderii lecitinei cu 10% și al creșterii celorlalte două. De asemenea este scăzut acidul linoleic. Într-o altă maladie sanguină, sferocitoza ereditară, cu deficit intrinsec în membrana eritrocitară apare o modificare a diferitelor fosfolipide (concentrație foarte ridicată de lizofosfatidiletanolamină cu deficiența enzimei de transformare a acesteia în fosfatidiletanolamină) și cu o alterare a raportului lipide-proteine. S-a arătat de asemenea că în membrana sferocitelor, sfingomielina, lecitina și fosfatidilserina sînt alterate prin lipsa acizilor grași cu lanț lung (carboni 22 și carbon 24). În anemia hemolitică familială nesferocitară apare o concentrație crescută de lecitină, datorită absenței de esterificare a ei în fosfatidiletanolamină. În boli hepatice ca hepatită, ciroză, icter, se observă modificări lipidice în membrana hematiilor, fie numai în conținutul colesterolic, fie și în cel fosfolipidic, influențînd în felul acesta echilibrul membranar, schimburile dintre celule și plasma sanguină și apariția de hematii cu forme anormale.

Scanned with OKEN Scanner

Așa cum reiese din cele expuse, *raportul colesterol-fosfolipide* este deosebit de important pentru menținerea fluidității de membrană, pentru buna funcționare a celulei, fiind la eucariote în continuă reglare. Alterarea sa duce la modificări ale permeabilității ionice, fragilității și microvîscozității, a difuziei laterale, a interacțiunii cu proteinele.

Proteinele din membrana eritrocitului — în proporție de 50—52% — înt alcătuite din aminoacizi asemănători celor aflați în alte membrane, cu deosebirea că proteinele eritrocitare membranare conțin un procent mai ridicat de reziduuri acide (21%) față de cele bazice (12%). Proteinele structurale și enzimatice sînt dispuse asimetric, pe cele două fețe ale membranei. Astfel pe fața externă sînt localizate enzime ca *acetilcolinesteraza*, care are drept scop să distrugă neurotransmițătorul circulant (acetilcolina); *nicotinadenindinucleotidaza* (NAD-aza) intervine într-un complex enzimatic generator de nucleozizi permeabili, ce pătrund în hematie, sau din nucleozizi impermeanți circulanți. Tot pe fața externă se găsesc și proteine ce leagă ouabaina sau proteine speciale antigenice. Fața internă a membranei hematiei este sediul enzimelor *NADH-diaforaza, gliceraldehid-3-dehidrogenaza, ATP-aza, proteinkinaza* — toate implicate în metabolismul intern celular. Tot pe fața internă se găsește și o altă proteină — *spectrina* — , fără activitate enzimatică, sau alte tipuri de proteine dintre care unele reprezintă locusuri de legare a AMP-ului ciclic.

Spectrina se asociază cu filamentele de actină și miozină (care se află în raport de 80/1) și cu o proteină ajutătoare (banda 4,1 cu greutatea moleculară de 80 000). Ele formează o plasă sub membrana eritrocitară ce funcționează ca un sistem contractil local (asemănător celui realizat de filamentele de actină din mușchi), cu rol în determinarea microarhitecturii celulei și cu rol dinamic în generarea mișcării membranei eritrocitare. De asemenea aparatul contractil asociat membranei celulare poate fi responsabil de modificările dependente de ATP în menținerea formei eritrocitului. Întregul ansamblu de citoschelet subplasmalemal este atașat la suprafața citoplasmatică a membranei de suprafață a eritrocitului prin asociația specifică spectrină + ankirină (proteină cu greutatea moleculară de 210 000). Printre proteinele aflate în toate straturile membranei se mai găsesc *glicoforina* și *proteina benzii III*. În membrana hematiilor bătrîne se observă o rearanjare a proteinelor integrale în bistratul lipidic, însoțită de dispariția unor proteine periferice cum ar fi spectrina.

Hidrații de carbon din membrana eritrocitului reprezintă aproximativ 8% din masa totală plasmalemală. Sînt localizați pe suprafața sa externă, în principal sub formă de glicoproteine și glicolipide. Practic, toate proteinele fetei externe plasmalemale eritrocitare (antigeni, enzime, receptori și altele) sînt în general glicozilate. Glicoproteinele și glicolipidele din membrane sînt orientate asimetric, cu lanțurile lor oligozaharidice spre exteriorul celulei, interacționînd cu anticorpi, virusuri și alte molecule.

Acidul sialic, cel mai bine reprezentat în carbohidrații de suprafață, prin grupele sale carboxil, este principalul responsabil de încărcătura negativă a suprafeței eritrocitului. Grupările sialice ale glicoforinei (glicoproteină), aflate pe fața externă a membranei eritrocitului, apar distanțate datorită faptului că la om se află o proporție de 33 de grupări sialice pentru o moleculă de glicoforină.

Scanned with OKEN Scanner

Membrana eritrocitului conține pe suprafața sa externă antigeni numiți *aglutinogeni*, cei mai importanți fiind aglutinogenii A și B. După prezența sau absența lor pe suprafața externă a eritrocitelor, indivizii se împart în patru tipuri sanguine: A, B, AB și O. Aglutinogenii A și B se găsesc și pe alte tipuri de celule din glandele salivare, pancreas, ficat, plămîni, rinichi, testicule, ca și în lichide ca saliva, lichidul amniotic.

Anticorpii antiaglutinogeni se numesc *aglutinine*. Unii indivizi cu aglutinogen A pot avea și un alt aglutinogen numit A_1, astfel că grupul sanguin A este împărțit în două clase: A_1 (cu doi aglutinogeni A, respectiv A și A_1) și A_2 (cu un singur aglutinogen A). Ca urmare, indivizii pot fi incluși în 6 grupe sanguine în loc de 4, respectiv B, O, A_1, A_2, A_1B și A_2B.

Grupul A conține aglutinine anti-B, grupul B conține aglutinine anti-A, grupul O conține aglutinine anti-A și anti-B iar grupul AB nu conține aglutinine circulante. Astfel grupul sanguin O este donator universal iar grupul sanguin AB este primitor universal.

De aceste grupe sanguine se ține seama în practica medicală cînd se efectuează transfuzia de sînge. Incompatibilitatea de grupă sanguină determină aglutinarea hematiilor și apoi hemoliza lor cu eliberare de hemoglobină în plasmă. În aceste situații reacțiile organismului sînt foarte severe: apar icterul, datorită creșterii bilirubinemiei plasmatice, tulburări renale ce duc la anurie și moartea individului.

Alte aglutinogene decît cele ale sistemului ABO au fost detectate pe suprafața membranei eritrocitare (peste 500 bilioane posibile cunoscute). După calculele actuale, numărul de fenotipuri ar fi de trilioane. Dintre aceste sisteme cel mai bine cunoscute și delimitate clinic sînt cele care alcătuiesc grupele Lewis. Mai există însă alte sisteme moleculare antigenice, destul de bine definite chimic dar mai puțin antigenic, respectiv grupele M,N și P, și altele a căror natură este prea puțin stabilită chimic.

În afară de acești antigeni, pe suprafața externă a membranei eritrocitare s-a evidențiat și *factorul Rh* (numit astfel de la maimuța Rhesus la care a fost prima dată studiat). Factorul sau sistemul Rh este alcătuit din mai mulți antigeni, dintre care cel mai puternic este factorul RhD. Indivizii care au aglutinogenul D sînt „Rh-pozitivi", iar cei ce nu au acest aglutinogen sînt „Rh-negativi". Indivizii Rh-negativi răspund prin formare de aglutinină anti-D cînd li se transfuzează sînge cu celule pozitive cu antigen D. Dacă li se reinjectează sînge, trebuie să se țină seama de acest aspect pentru a evita reacțiile transfuzionale adverse. Un alt aspect de incompatibilitate Rh se ivește la mama gravidă Rh-negativă cu fetus Rh-pozitiv. Aceasta deoarece mici cantități din sîngele fetal ajungînd în circulația maternă determină apariția de aglutinine anti-Rh în post-partum. La următoarea sarcină, aglutininele mamei trec prin placentă la fetus, determinînd la acesta hemoliza sîngelui și boala denumită *boala hemolitică a nou-născutului* sau *eritroblastoza fetală*. Dacă hemoliza este severă, fetusul poate muri în uter sau nou-născutul poate prezenta anemie, icter grav și edeme.

Durata de viață a hematiei adulte în sîngele circulant este de aproximativ 100—120 de zile, după care, îmbătrînită, este oprită și distrusă în principal în splină de către macrofage, dar și în măduva osoasă sau ficat. Cu timpul, splina se hipertrofiază ușor prin hipertrofia macrofagelor. Rareori eritrocite — îmbătrînite sau alterate — pot fi distruse intravascular prin acțiunea complementului.

Scanned with OKEN Scanner

7.3.2.3. Funcţiile eritrocitului

Prin cantitatea mare de hemoglobină pe care o conţine, celula are rolul principal de a transporta gaze, respectiv oxigenul de la plămîni către ţesuturi şi bioxidul de carbon de la ţesuturi către plămîni. Legăturile hemoglo-

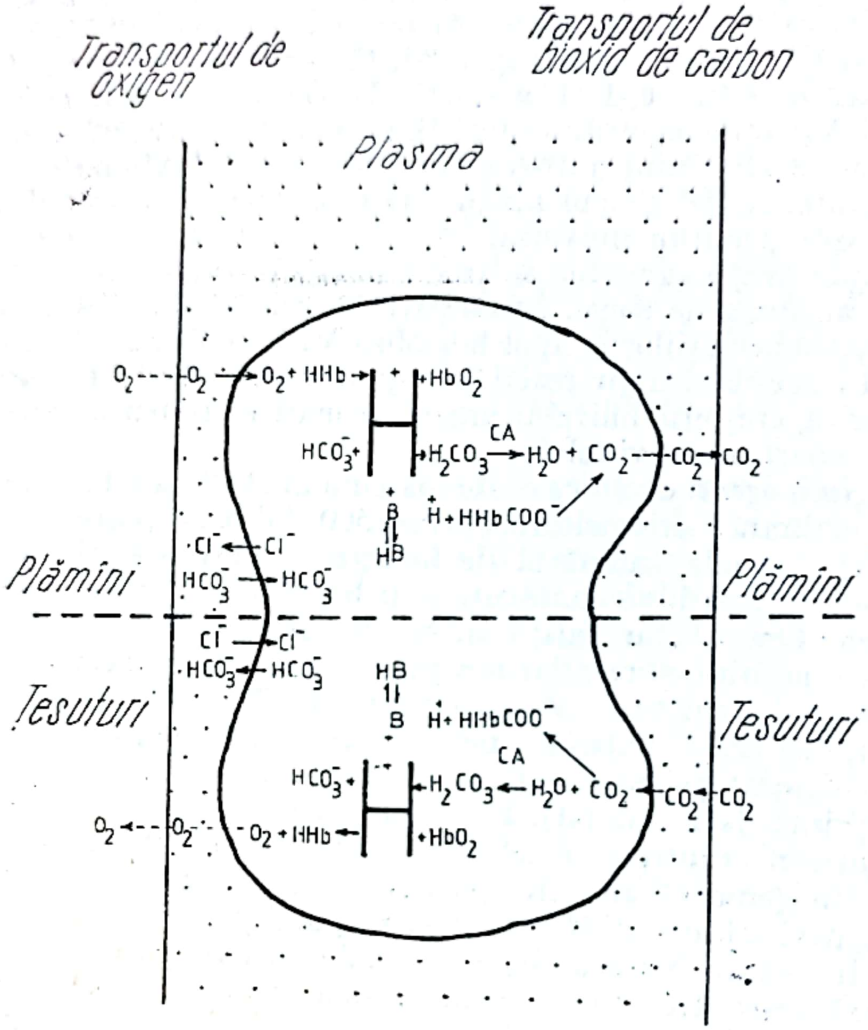


Fig. 7. 27. — Transportul de gaze efectuat de eritrocit.

binei cu aceste gaze sînt rapide, se fac şi se desfac foarte repede. Ele sînt uşurate de prezenţa unor enzime ca *methemoglobin-reductaza*, care menţine fierul în hemoglobină în stare feroasă neoxidată, sau *carboanhidraza*, care leagă şi dezleagă bioxidul de carbon de hemoglobină.

Hemoglobina combinată cu oxigenul formează *oxihemoglobina*, iar atunci cînd leagă bioxidul de carbon, realizează *carbaminohemoglobina*. Cu unele gaze ca oxidul de carbon, hemoglobina realizează legături ireversibile *(carboxihemoglobina)*, răspunzătoare de intoxicaţiile grave cu gaze de eşapament, ardere incompletă cu cărbuni etc. (fig. 7.27).

Scanned with OKEN Scanner

7.3.3. PLACHETA SANGUINĂ – TROMBOCITUL (THROMBOCYTUS)

Număr. Trombocitele se găsesc în sîngele periferic în proporție de 150 000—400 000/mm³ (150—400 × 10^9/l). Creșterea numărului lor, denumită *trombocitoză*, ca și scăderea numărului acestor celule sanguine, numită *trombocitopenie*, se observă în special în boli ale sîngelui. În mod normal orice scădere a numărului de plachete circulante este imediat compensată de răspuns medular prompt.

7.3.3.1. Forma celulei

Este elipsoidă, de lentilă biconvexă, atunci cînd se află în stare proaspătă în vasele sanguine. Pe frotiu, celula prezintă forme diferite, colțuroase ca o stea, discoidală, poligonală etc., depinzînd de gradul de uscare a frotiului, de timpul ce s-a scurs între recoltarea sîngelui și efectuarea frotiului etc.

Diametrul trombocitului este de 3—5 μm; este deci cea mai mică celulă sanguină.

7.3.3.2. Structura și ultrastructura plachetei sanguine

Placheta sanguină este anucleată fiind formată din membrană și citoplasmă. Citoplasma se prezintă la examenul microscopic alcătuită din două zone: una externă, ectoplasmică, clară, numită hialomer, și alta centrală, întunecată, numită granulomer.

Membrana de suprafață a plachetei sanguine, groasă de 7—19 nm, lipoproteică, este acoperită de un strat de glicoproteine gros de 15—20 nm, care permite absorbția unor proteine plasmatice, în special fibrinogen și factorul 8, jucînd astfel un rol în interacțiunea dintre trombocit și peretele vascular sau cu alte suprafețe străine (adeziune) și cu alte plachete (agregare). Pe suprafața externă a membranei celulare se găsesc diferite locusuri specifice antigenice, ca și receptori pentru agenții stimulatori sau inhibitori ai procesului de agregare plachetară, locusuri prezente în special în invaginările suprafeței trombocitului. Analiza glicocalixului trombocitar a arătat existența a trei componente majore, și anume: glicoproteina I cu greutate moleculară de 155 000 daltoni, glicoproteina II cu greutate moleculară de 120 000 daltoni și glicoproteina III cu greutate moleculară de 95 000 daltoni, care sînt implicate în mecanismele de adezivitate la endoteliul vascular și de agregare plachetară.

Membrana trombocitului prezintă mici văluri ondulante și rare prelungiri dendritiforme. De asemenea la nivelul ei pot fi observate frecvente invaginări sau buzunărașe de pinocitoză al căror ansamblu constituie sistemul canalicular citoplasmatic, conectat cu suprafața plachetei.

Hialomerul conține microtubuli, microfilamente și diferite proteine implicate în procesul de coagulare sanguină (de exemplu trombostenina) (fig. 7.28).

Scanned with OKEN Scanner

Microtubulii sînt dispuși sub formă de bandă inelară în ectoplasmă, unde formează citoscheletul ce menține forma trombocitului. Microtubulii dispar la frig, placheta pierzînd forma de disc; ei se refac la cald, celula redobîndindu-și aspectul normal. În procesul de agregare plachetară unii microtubuli se strîng către centrul citoplasmei înconjurînd organitele celulare, alții sînt prezenți în pseudopodele trombocitului.

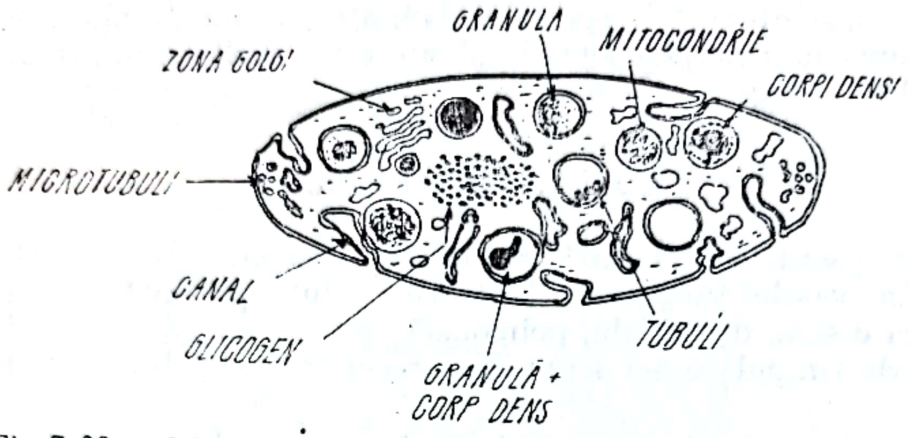


Fig. 7. 28. — Schema organizării ultrastructurale a plachetei sanguine.

Microfilamentele, distribuite în toată citoplasma, sînt alcătuite din proteine asemănătoare celulei musculare, respectiv actină 10%, miozină 1%, tropomiozină, troponină și alfa-actinină. Actina este asemănătoare celei musculare dar miozina diferă de cea musculară în ceea ce privește mărimea și interacțiunea cu actina. Contracția acestor proteine duce la modificarea formei trombocitului în procesul de secreție plachetară și în retracția coagulului sanguin. De asemenea se găsesc și filamente alcătuite din proteine, asemănătoare actomiozinei, numite *trombostenină*.

Granulomerul, zona centrală electronodensă a trombocitului, este un ansamblu de granule și vacuole de mărimi diferite (mici, mijlocii și mari) și cu densități diferite la fluxul de electroni (clare sau întunecate). El este alcătuit din *2—3 mitocondrii* mici, cu 2—3 criste mitocondriale fiecare; cîțiva *lizozomi* ce apar; pe frotiu ca granulații azurofile; *2—3 peroxizomi* ce conțin catalază; cîteva microvezicule *golgiene;* puține profiluri de *reticul endoplasmic;* cîțiva *ribozomi* liberi; *granule dense* (corpi denși ai trombocitului) cu talie de 0,5—1,5 nm, ce conțin serotonină (5-hidroxitriptamină), adeninnucleotizi nemetabolici, epinefrină (adrenalină), ioni de calciu.

Originea. Plachetele sanguine se formează în măduva roșie hematogenă în linia megakariocitară. Trec apoi în sîngele periferic, unde au o durată de viață de 8—12 zile. După acest interval trombocitele sînt reținute și distruse în sistemul macrofag al organismului, cu precădere în cel splenic.

7.3.3.3. Funcțiile trombocitului

Celula este direct implicată în procesul de coagulare a sîngelui, deci de formare a coagulului sau a cheagului sanguin. În mod normal, cînd peretele vascular este indemn, trombocitele circulă odată cu sîngele fără să adere la peretele vascular.

Scanned with OKEN Scanner

În *hemostază* celulele endoteliale iau parte activă prin: *a)* sinteza unor factori implicați în fenomenul de coagulare sanguină cum ar fi prostaglandina I_2 (PGI_2), care are acțiune vasodilatatoare și puternic inhibitoare asupra agregării plachetare, factorul von Willebrand (factorul VIII), o parte din trombostenina tisulară, activatorul plasminogenului, elastina și colagenul membranei bazale, fibronectina etc. sau *b)* prin îndepărtarea din plasma sanguină a unor agenți ce ar putea provoca agregarea plachetară, cum ar fi serotonina, adenin-nucleotizii, prostaglandina E_1 alfa, bradikinina, angiotensina I.

Dacă se produce o lezare sau o rupere a peretelui vascular, plachetele sanguine aderă la structurile acestuia. *Aderarea* este rezultatul interacțiunii dintre glicoproteina I din membrana trombocitului și factorul plasmatic VIII care leagă placheta de structurile subendoteliale; sau al interacțiunii dintre fibronectina membranei de suprafață a plachetei cu colagenul din pereții vasculari. Aderarea sau adeziunea plachetelor la țesutul conjunctiv intra- sau perivascular, contrar procesului de agregare trombocitară, este un fenomen ireversibil și foarte rapid.

După ce au aderat de peretele vascular lezat, trombocitele se grupează realizînd fenomenul de *agregare plachetară*. Acesta este facilitat și de prezența moleculelor ADP care iau naștere din moleculele ATP, puse în libertate la locul rupturii vasculare din trombocite, din eritrocite și din celulele conjunctive distruse la locul lezării vasculare. Pe lîngă moleculele ADP intervin și alți agenți agregogeni ca: prostaglandinele G_2 și H_2, tromboxanul A_2, trombina, colagenul, adrenalina, noradrenalina și alți factori care activează funcția plachetelor sanguine. Moleculele de ADP, ca și majoritatea agenților de agregare, se leagă de receptori specifici de pe membrana plachetelor, determinînd modificarea formei acestora din disc în sfere spinoase, prin formarea multor pseudopode mici. Fenomenul de agregare plachetară necesită prezența în mediul înconjurător a ionilor bivalenți, în special de calciu și magneziu, precum și o concentrație de fibrinogen nu mai mică de 0,2 g/l. ADP-ul induce, în prezența cationilor bivalenți, legarea fibrinogenului de receptorii de suprafață ai plachetelor, determinînd modificarea formei acestora.

Fenomenului de agregare plachetară îi urmează cel de *trombocitoliză* sau *metamorfoză vîscoasă*, determinat de contactul plachetelor cu colagenul din peretele vascular rupt sau din țesutul conjunctiv înconjurător locului de hemoragie. Colagenul reprezintă astfel unul din factorii cei mai activi de adezivitate și agregare plachetară. Procesele sînt precedate de stimularea sintezei în plachete a prostaglandinelor din endoperoxizi și a tromboxanului A_2 (fig. 7.29). În procesul de metamorfoză vîscoasă trombocitul se modifică prin acumulare de apă, care face ca celula să devină mai mare, balonizată, iar în citoplasma ei să dispară granulomerul prin ruperea endomembranelor granulelor componente. Citoplasma devine astfel de aspect omogen vîscos, membrana celulară se rupe și întreg conținutul trombocitelor se revarsă în afară, formînd o masă vîscoasă lîngă vasul lezat.

Sîngele revărsat în afara vasului realizează un coagul datorită prezenței și interacțiunii la locul hemoragiei a unor factori tisulari (tromboplastina), a unor factori sanguini plasmatici (protrombina, fibrinogenul) și a unor factori plachetari (F_3, F_4, trombostenina, ionii de calciu etc.). Suita evenimentelor începe cu *activarea tromboplastinei* de către factorul F_3 plachetar. Acesta acționează ca o enzimă asupra *protrombinei*, pe care o transformă în *trombină*.

Scanned with OKEN Scanner

La rîndul ei, trombina determină transformarea *fibrinogenului* în *fibrină*. Aceasta din urmă va polimeriza și va forma o rețea de fibrile fine în ochiurile căreia se găsește sînge revărsat (plasmă și celule sanguine). Atît fibrinogenul cît și fibrina sînt sintetizate de ficat și eliberate în plasma sanguină. Asupra fibrinei vor acționa în principal moleculele contractile de *trombostenină* și *ionii de calciu*, producînd retracția coagulului sanguin. În același timp serotonina din plachete, ca și alți factori vasomotori aflați și eliberați

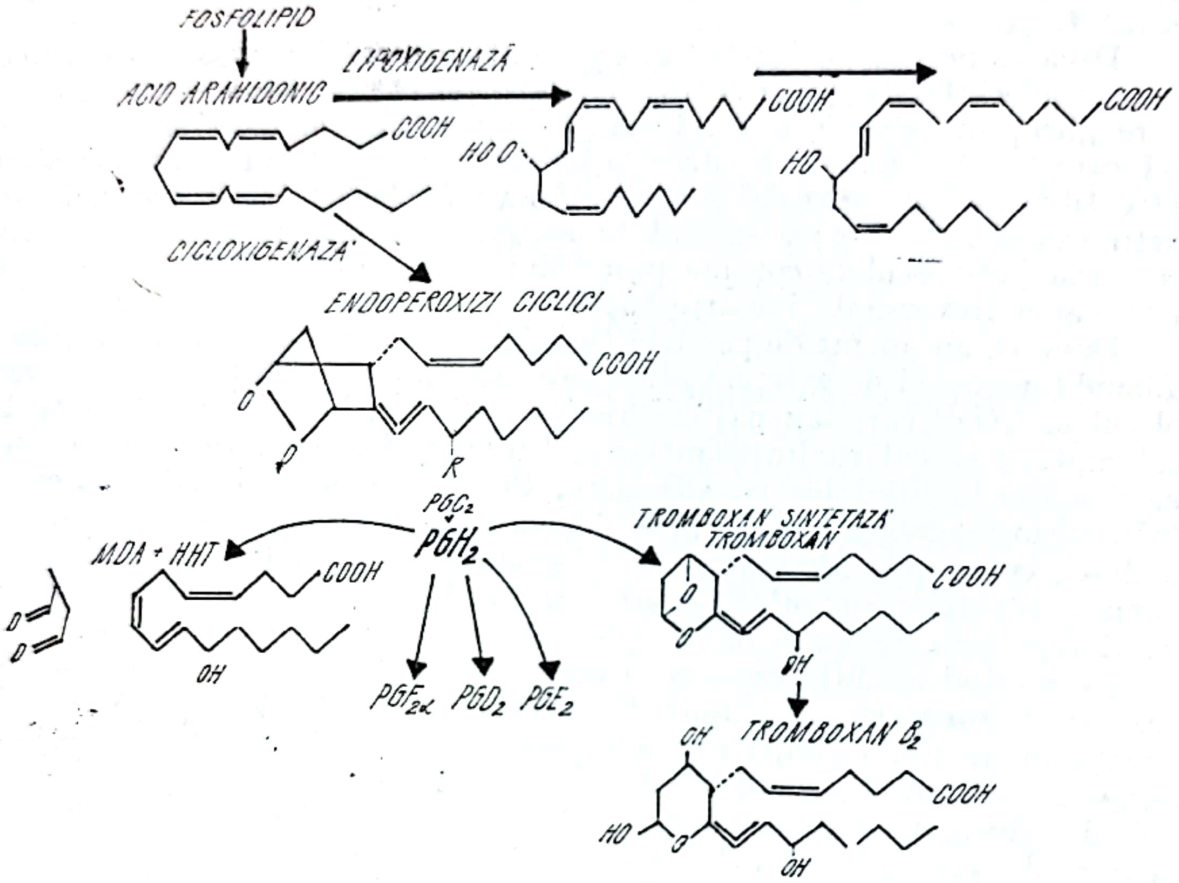


Fig. 7. 29. — Metabolismul prostaglandinelor în trombocit.

din trombocite, produc contracția vasului respectiv. Unii indivizi suferă de boli genetice care determină tulburări ale procesului de coagulare. În una dintre aceste boli, numită *hemofilie*, fibrinogenul este împiedicat de a se transforma în fibrină, ceea ce duce la imposibilitatea formării coagulului sanguin.

Fibrina din coagul sau din trombus poate fi degradată în produși solubili. Procesul poartă denumirea de *fibrinoliză* și *tromboliză*. Degradarea se realizează prin *sistemul plasminogen-plasmină*, compus din patru componente, și anume: *plasminogenul*, proteină plasmatică în concentrație de 200 ng/ml, *plasmina*, *activatorii de plasminogen* care pot fi componente ale sîngelui, endoteliul vascular și *inhibitorii de plasminogen* cum ar fi alfa-antiplasmina, alfa-macroglobulina etc. (fig. 7.30). În acest sistem proteina precursoare inactivă, care este plasminogenul, este activată în enzima plasmină de către un activator, reacția fiind controlată de prezența inhibitorilor. Procesul

Scanned with OKEN Scanner

fibrinolitic funcționează în organism ca un mecanism homeostatic major, controlînd depunerea de fibrină pe peretele vascular. Este posibilă activarea procesului fibrinolitic în scopuri terapeutice.

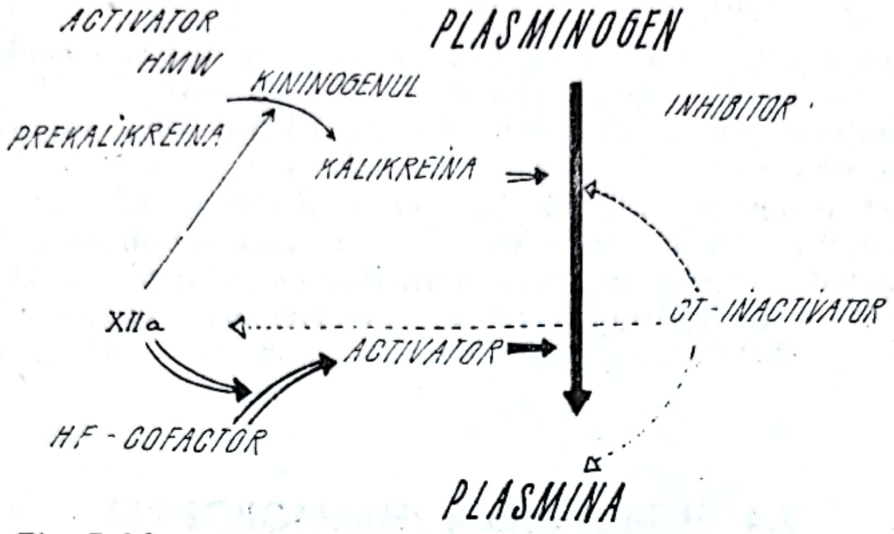


Fig. 7.30. — Sistemul fibrinolitic: plasminogen, plasmină, activatori, inhibitori.

7.3.3.3.1. Alte funcții ale plachetelor sanguine

Plachetele intervin în *procesele inflamatorii*, acumulîndu-se la locul de invazie microbiană, unde eliberează factori care cresc permeabilitatea peretelui vascular (serotonina, PGE_2), sau alții care sînt chemotactici pentru granulocite (HETE = 12-hidroxieicosatetraenoic acid) (fig. 7.31).

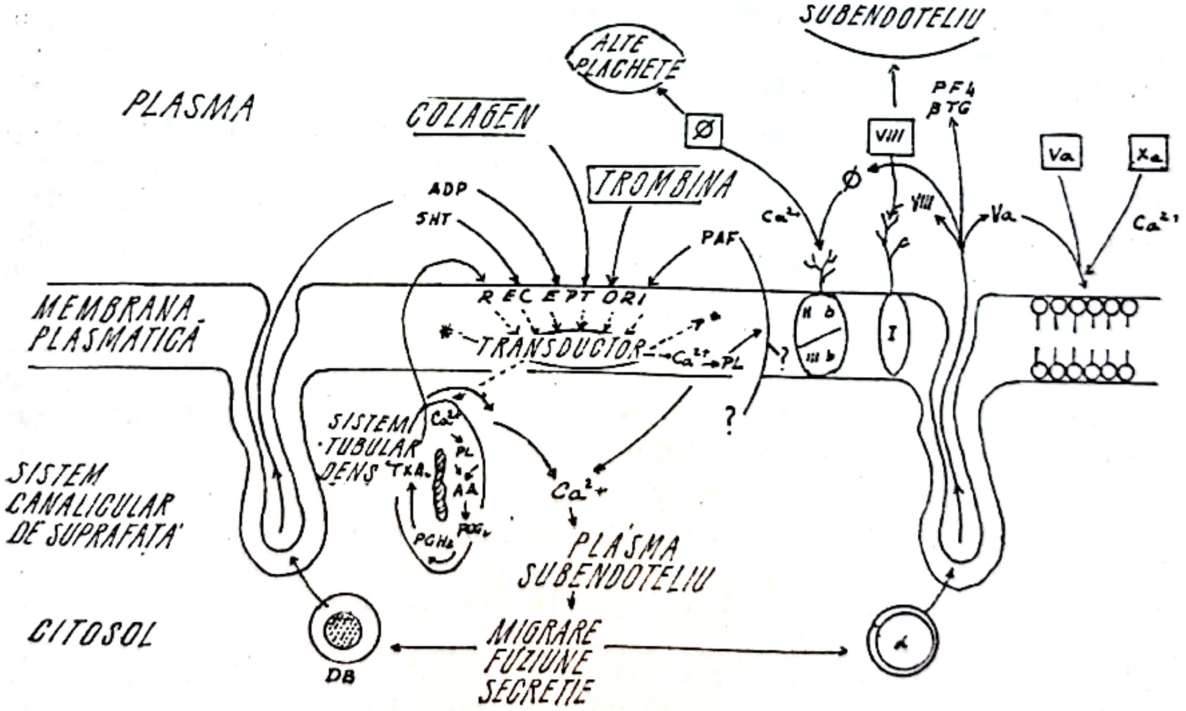


Fig. 7.31. — Schema interrelațiilor unor funcții plachetare:
PF4 — factorul 4 plachetar; *PL* — fosfolipaze; *B-TG* — beta-tromboglobulină; *I*, *IIb*, *IIIb* — glicoproteine; DB — corpi denși; *AA* — acid arahidonic; TxA_2 — tromboxan A_2; PGG_2, PGH_2 — prostaglandine; *5HT* — 5 hidroxitriptamina (serotonina); *PAF* — factorul activator al plachetelor.

Scanned with OKEN Scanner

Plachetele sanguine pot *endocita particule* foarte mici și numai uneori particule mari, prin agregarea lor în jurul acestora. Astfel plachetele pot endocita bacterii, pe care însă nu le omoară, sau pot ingera particule de cărbune curățind astfel sîngele circulant.

Plachetele sanguine intervin și în *reacțiile imune*, răspunzînd prin agregare și eliberare de diferite substanțe la stimularea lor de către complexe imune sau agregate de IgG. În asemenea situații poate apărea o trombocitopenie tranzitorie.

Plachetele sanguine intervin în *vindecarea rănilor*. Ele eliberează diferiți factori stimulatori, printre care unii cu acțiune asupra creșterii fibrelor musculare netede, arteriale sau a creșterii fibroblastelor pielii. Acești factori de creștere joacă un rol important în patogenia aterosclerozei. Serotonina eliberată de plachetele sanguine stimulează secreția de colagen de către fibroblaste.

7.4. HEMOPOIEZA (HAEMOPOESIS)

7.4.1. GENERALITĂȚI

Hemopoieza sau hematopoieza este procesul de formare a elementelor figurate ale sîngelui, proces ce se desfășoară pe toată durata vieții individului în măduva roșie hematogenă, aflată în oasele late (stern, coxal, epifizele unor oase lungi, corpurile vertebrelor) (planșa 7.5).

În privința formării celulelor sanguine există trei teorii: aproape unanim admisă este *teoria unicistă sau unifiletică*, propusă de Maximov și susținută mai recent de Yoffy, după care toate celulele sîngelui iau naștere în măduva hematogenă dintr-o singură celulă-stem (susă) multipotențială. Mult mai puțin admise sînt *teoria dualistă sau bifiletică* a lui Naegeli, care susține ideea formării celulelor sanguine din două tipuri de celule-stem: dintr-un tip stem s-ar forma granulocitele și agranulocitele iar din celălalt tip stem ar lua naștere eritrocitele și trombocitele; *teoria trialistă sau trifiletică* a lui Schilling susține că monocitele se formează din celule-precursor diferite de cele granulocitare și eritrocitare; *teoria pluralistă sau polifiletică susține* existența în măduvă de celule-stem distincte pentru fiecare tip de celulă sanguină, în consecință fiecare element figurat circulant luînd naștere dintr-un anumit tip de celulă de origine.

Existența celulei-stem pluripotentă a fost dedusă din numeroase observații experimentale *in vivo* sau *in vitro*. Datele constatate la un număr de specii de animale, precum și unele observații efectuate la om, sugerează că celula-stem pluripotentă este distribuită predominant în măduva osoasă dar o găsim și în sîngele circulant. La om, unele observații indirecte vin să susțină în plus această afirmație: astfel cromozomul Ph 1, caracteristic leucemiei mieloide cronice, apare în celulele liniei granulocitare, eritrocitare, megacariocitare și monocitare, probă a existenței acestei celule multipotente în măduva osoasă hematogenă. În același sens pledează restabilirea hemopoiezei mieloide în anemiile aplastice sau în leucemiile acute prin transplant medular, precum și refacerea funcțională precoce a măduvei hematogene

Scanned with OKEN Scanner

după administrarea de substanțe citotoxice, prin transfuzie cu leucocite periferice. Transfuzia rămîne fără efect în anemia aplastică, în timp ce hemopoieza răspunde cu succes în această boală după transplantul de măduvă.

Celula-stem pluripotentă (numită în trecut hemocitoblast) nu este identificată morfologic, dar se pare că ar arăta ca o celulă mononucleară mică, asemănătoare limfocitelor mici, mature. Prin mitoze celulele-stem asigură depozitul multipotențial al măduvei osoase hematogene. O parte dintre ele se angajează în diferențiere, realizînd grupul *celulelor precursoare sau progenitoare angajate (committed)* pentru fiecare linie celulară sanguină, care nu pot fi încă recunoscute morfologic. Menținerea acestui grup celular în măduvă este reglată prin mecanism *feed-back* de compartimentul stem pluripotent și de o serie de substanțe cu rol hormonal, diferite pentru fiecare tip celular sanguin (de exemplu: eritropoietina, granulopoietina etc.).

Celula-stem reprezintă tipul de celulă multipotențială nu numai în linia celulelor hemopoietice din măduva osoasă dar și din alte organe (exemplu: celulele de origine ale epiteliului mucoaselor); este capabilă de un *turnover* și/sau regenerare prin propria ei capacitate de proliferare, în scopul menținerii numărului propriu de celule în timpul vieții organismului.

Existența celulei-stem hemopoietice pluripotente, ca și a celulelor progenitoare *committed*, a fost dovedită experimental la șoarece prin repopularea sistemului hematopoietic iradiat din măduva grefată cu o singură clonă marcată cromozomial. Pe lîngă repopularea măduvei cu celule, se formează și în splină discrete agregate sau colonii de celule hemopoietice ce conțin celule pe cale de diferențiere în linia eritrocitară, granulocitară, megacariocitară, limfocitară și monocitară. În consecință, studii citogenetice cu cromozomi marcați au arătat că fiecare colonie a derivat dintr-o singură celulă, denumită *colony-forming unit in spleen (CFU-S)*. Colonii asemănătoare au fost observate și la șobolani, mai puțin la alte specii. Aceste observații au fost reproduse și prin cercetări *in vitro*, în culturi, celula de origine fiind denumită *colony-forming unit in culture (CFU-C)*, în loc de CFU-S sau, mai recent, *colony-forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM)*. Studiile respective au adus probe în sprijinul existenței unei celule comune de origine pentru granulocite și monocite.

La adult, cea mai mare concentrație de celule CFU-GM se găsește în măduvă, în proporție de aproximativ o celulă la 3 000 de celule nucleate. Mai rar ele pot să se găsească în sîngele periferic și în splină. CFU-GM prezintă un ciclu proliferativ, în contrast cu CFU-S. CFU-GM este o celulă mică, cu raport nucleocitoplasmatic mare. Morfologic se aseamănă cu un limfocit tranzițional. CFU-GM proliferează *in vitro* pentru a forma colonii vizibile macroscopic numai în prezența unui factor umoral activ, numit *colony stimulating activity* (CSA), ce poate fi obținut din leucocitele normale, placentă sau urină. CSA este o proteină cu G.M. de aproximativ 45 000 daltoni. În sînge, principala sursă de CSA este monocitul, urmat de limfocit. Granulocitul nu produce CSA. În laborator, poate fi obținut din celule neoplazice. CSA este echivalent cu granulopoietina. *In vitro* polimorfonuclearele inhibă producerea de CSA din monocite, probabil prin eliberarea lactoferinului granulocitar ce interacționează cu membrana monocitului. Chalonele specifice pentru polimorfonucleare inhibă granulopoieza atît *in vitro* cît și *in vivo*. Același efect îl au prostaglandinele E_1 (PGE_1), E_2 (PGE_2).

Scanned with OKEN Scanner

7.4.2. GRANULOCITOPOIEZA (GRANULOCYTOPOESIS)

După naștere, procesul de formare a leucocitelor granulare (polimorfonucleare) are loc în mod normal în măduva osoasă hematogenă. El presupune înmulțirea, maturarea și diferențierea celor trei tipuri de granulocite, respectiv neutrofilul, eozinofilul și bazofilul din celula precursoare angajată *(committed)*. În măduvă, formarea granulocitelor se constituie astfel într-o primă etapă mitotică, urmată de o a doua etapă intramedulară postmitotică, determinînd formarea a patru grupe sau compartimente celulare medulare diferit maturate. Acestea sînt următoarele:

a) Compartimentul celulelor-stem și al celulelor precursoare, neidentificate morfologic.

b) Compartimentul mitotic în care se întîlnesc frecvente diviziuni-mitotice și un început de maturare celulară (mieloblaste, promielocite, mielocite). Formarea celulelor în acest compartiment durează aproximativ 135 ore pentru o generație celulară.

c) Compartimentul de maturare—nemitotic conține metamielocite, granulocite nesegmentate și granulocite segmentate. Celulele nu se mai divid și se maturează, diferențiindu-se în interval de 130—158 ore.

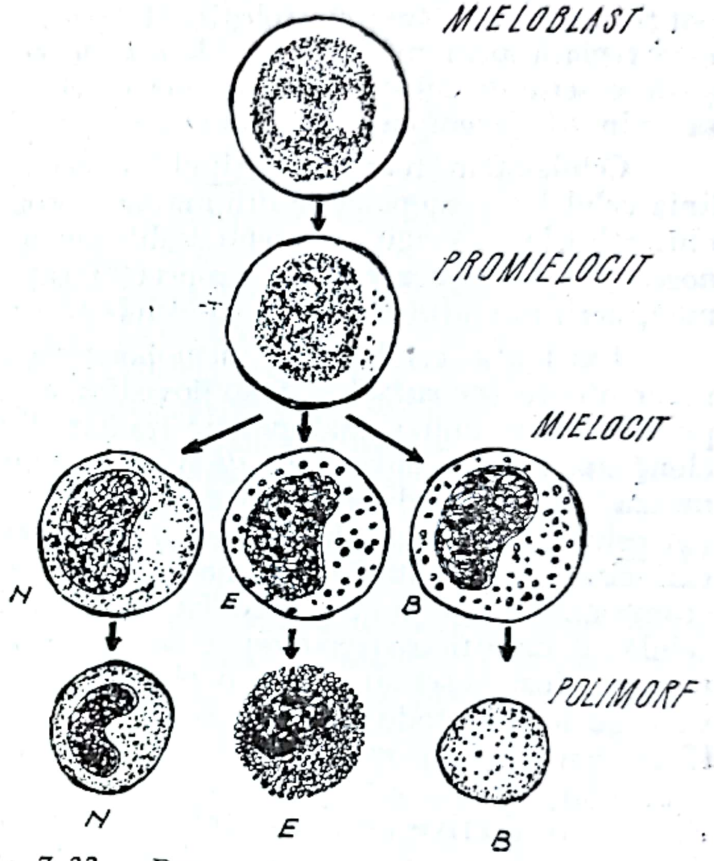


Fig. 7.32. — Reprezentarea schematică a granulocitopoiezei.

d) Compartimentul granulocitar de rezervă medulară reprezintă depozitul de celule mature și diferențiate (granulocite nesegmentate și granulocite segmentate). Numărul lor este de 13×10^9 celule/kg la omul sănătos. În total, trecerea de la celula-stem și pînă la granulocitul matur necesită un interval de 265—293 ore (11—12 zile).

În sîngele periferic există două grupe de granulocite:

— grupul granulocitelor circulante;

— grupul granulocitelor marginale sau marginate, aderente de-a lungul pereților vasculari (fig. 7.32 și planșa 7.5).

Mieloblastul este prima celulă din linia granulocitară ce poate fi recunoscută morfologic în măduva hematogenă. Mieloblastul derivă din celula precursor angajată spre linia granulocitară. El are diametrul de 10—15 μm. Nucleul său este mare, palid, cu eucromatină predominantă și cu prezența a 1—3 nucleoli. Citoplasma este relativ puțină, bazofilă, bogată în ribozomi

Scanned with OKEN Scanner

liberi. Se mai observă rare mitocondrii, lizozomi și reticul endoplasmic rugos, slab dezvoltat. Raportul nucleoplasmatic este de 6/1. Prin diviziune mitotică (de obicei o singură mitoză/celulă) mieloblastul va da naștere la două promielocite.

Promielocitul este o celulă mai mare decît mieloblastul, cu diametrul de aproximativ 20 μm. Nucleul celulei, rotund-ovoid, este mare, bogat în eucromatină dar și cu mici zone heterocromatiniene. Conține 1—3 nucleoli proeminenți, raportul nucleu-citoplasmă fiind de 4/1. Puternic bazofilă, citoplasma sa este bogată în organite celulare ribozomale libere, frecvente mitocondrii, un reticul endoplasmatic rugos și complex Golgi dezvoltat. În plus, în citoplasmă apar frecvente *granulații bazofile (granulații primare)* ce reprezintă lizozomii celulei, formați pe fața concavă (matură) a cisternelor golgiene. Viața promielocitului este de 24—48 ore, după care se divide mitotic. Se pare că are loc o singură mitoză/celulă, realizîndu-se două mari celule mielocitare.

Mielocitul are diametrul de 16—25 μm. Nucleul, ovoid, dispus adeseori excentric, în raport de 2/1 cu citoplasma, este bogat în heterocromatină și nu conține nucleoli (planșa 7.7). Citoplasma abundentă, ușor bazofilă, conține organite celulare bine reprezentate. Pe lîngă numeroasele granule azurofile primare, apar și *granule specifice secundare*, formate la nivelul feței imature (convexe) a complexului Golgi. Se diferențiază astfel cele trei tipuri de mielocite, respectiv neutrofile, eozinofile și bazofile. Mielocitul are o durată de viață de 24—48 ore. Se divide apoi de 2—3 sau chiar 5 ori (planșele 7.8 și 7.9), pentru a da naștere unor celule mai diferențiate — metamielocitele —, care se găsesc în compartimentul nemitotic de maturare.

Metamielocitul are diametrul de aproximativ 12 μm, apropiat de cel al granulocitelor circulante. Nucleul este caracteristic, în formă de boabă de cafea sau de rinichi, cu o indentație adîncă, avînd raportul de 1,5/5 cu citoplasma. Cromatina este densă și condensată. Citoplasma, ușor bazofilă, conține un număr mic de mitocondrii, ribozomi; complexul Golgi și reticulul endoplasmic rugos sînt slab dezvoltați. Activitatea de sinteză scade foarte mult în metamielocite, celulele nu se mai divid. Numărul de granule azurofile scade, paralel crescînd cel al granulelor specifice secundare (neutrofile, eozinofile și bazofile). Metamielocitul reprezintă stadiul cel mai tînăr de granulocit diferențiat, putînd fi găsit și în sîngele circulant în proporție redusă, de 1—5% de granulocite.

Granulocitul nesegmentat (band cell) — neutrofil, eozinofil și bazofil — are nucleul în formă de bastonaș foarte curbat, ca o potcoavă, prezentînd adeseori un început de formare a lobilor, fără separarea acestora. Celula se găsește în sîngele periferic în proporție de 3—5% granulocite. Stimularea hemopoiezei, în special a granulocitopoiezei în afecțiuni mai ales inflamatorii, este urmată în mod normal de creșterea numărului polimorfonuclearelor nesegmentate în sîngele circulant. Se consideră că acest răspuns denotă buna funcționare a măduvei hematogene.

Granulocitul segmentat este ultimul stadiu de diferențiere, celulele aflîndu-se în sîngele periferic în proporție de 65—75% pentru neutrofile, 1—3% pentru eozinofile și 0,5—1% pentru bazofile.

Date privind cinetica granulocitelor la omul normal

— Timpul de tranzit pentru formarea granulocitelor în măduvă este de 8—14 zile.

Scanned with OKEN Scanner

— Rata *turnover*-ului granulocitar este de $50 \times 340 \times 10^7$ celule/kg/zi.
— Timpul de dispariție a granulocitelor mature din sîngele periferie este de 4—10 ore.

Granulocitopoieza poate fi controlată *in vivo* prin mecanisme reglatorii, care urmăresc menținerea constantă a numărului de granulocite în circulație. Aceasta se realizează fie prin creșterea compartimentului celulelor-stem, fie prin creșterea ratei de producție în compartimentul mitotic și a eliberării granulocitelor din măduva hematogenă în sîngele periferic, fie prin modificarea raportului dintre granulocitele circulante și cele marginale, fie prin modificarea numărului de trecere a granulocitelor în țesuturi.

Reglarea granulocitopoiezei se face *in vivo* prin factori ce controlează producerea și maturarea celulelor. Un astfel de factor, numit *diffusible granulopoietic substance (DGS)*, are efect stimulator, în timp ce chalonele, prostaglandinele E_1 și E_2 și unele substanțe de natură lipoproteică inhibă granulopoieza — acestea din urmă cu acțiune dovedită mai ales *in vitro*. Eliberarea granulocitelor în sîngele periferic este controlată de un factor denumit *neutrophil releasing factor*, a cărui existență a fost dovedită și la om. Se vorbește și de un factor reglator asemănător eritropoietinei, care, pentru granulocitopoieză, ar fi *granulopoietina*.

7.4.3. LIMFOCITOPOIEZA (LYMPHOCYTOPOESIS)

Limfocitele iau naștere în viața intrauterină progresiv în ficat, splină și măduva osoasă (limfocite B și T). După naștere, ele se formează îndeosebi în organele limfoide centrale: în măduva hematogenă — limfocitele B, iar în timus — limfocitele T; în măsură mai mică se formează și în organele limfoide periferice — ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer. În măduva hematogenă se presupune existența unei celule-stem limfocitară, neidentificată morfologic pînă în prezent, celulă ce dă naștere limfoblastelor.

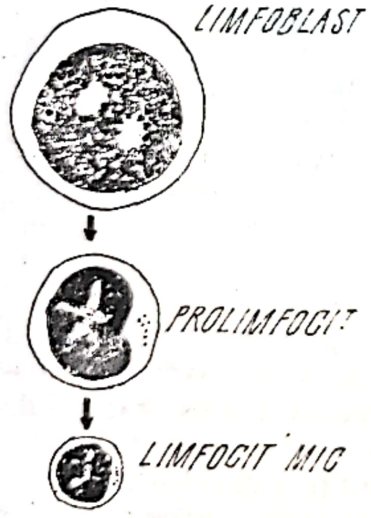


Fig. 7.33. — Schema limfocitopoiezei.

Limfoblastul, prima celulă a seriei respective cu structură identificată, are diametrul de 10—18 μm, nucleul cu 1—2 nucleoli ocupînd cea mai mare parte a celulei, în raport de 6/1 cu citoplasma (fig. 7.33; vezi și planșa 7.7). Cromatina este condensată de-a lungul membranei nucleare. Citoplasma bazofilă conține organite celulare relativ frecvente și granule azurofile în număr redus, avînd diametrul de 0,3—0,5 μm. Limfoblastul se aseamănă cu limfocitul activat. Limfoblastul va da naștere, prin diviziuni mitotice, unei celule mai diferențiate, numită prolimfocit.

Prolimfocitul este o celulă cu talie de 9—17 μm, puțin mai redusă decît a limfoblastului, cu un raport nucleoplasmatic de 4—5/1. Nucleul conține o cromatină densă și de obicei un singur nucleol, uneori greu vizibil din cauza abundenței heterocromatinei. Citoplasma, în cantitate mai redusă decît în limfoblast, este bazofilă și conține rare organite celulare și frecvente granule azurofile. Prolimfocitul va da naștere direct, fără diviziune, *limfocitului* circulant.

Scanned with OKEN Scanner

7.4.4. MONOCITOPOIEZA (MONOCYTOPOESIS)

Monocitele își au originea în măduva hematogenă, dintr-o celulă progenitoare ce pare a fi comună cu a granulocitelor. Din această celulă ia naștere precursorul monocitar, respectiv *monoblastul* (fig. 7.34). Celula nu este identificată în măduva hematogenă, dar faptul că astfel de celule apar în sîngele periferic în leucemia monocitară, sugerează că ea există și în țesutul medular.

Promonocitul ia naștere din monoblast prin diviziuni mitotice. Este prima celulă din serie, identificată în măduva hematogenă. Promonocitul se găsește în număr redus în măduvă. Celula are diametrul de 10—20 μm și un raport mare nucleocitoplasmatic. Nucleul este palid, citoplasma bazofilă conține un bogat reticul endoplasmic rugos, numeroși lizozomi, dar un reticul endoplasmic neted redus. Promonocitul se divide de 3—4 ori pentru a da naștere monocitelor. Durata sa de viață este de 7—9 ore.

Monocitul, celula adultă din seria respectivă, este eliberată în sîngele periferic, pe care îl părăsește după aproximativ 8 ore, traversînd pereții venulelor și capilarelor. Ajuns în țesuturi, se transformă în macrofag tisular. La om, monocitele se găsesc ca celule circulante și ca celule marginale, întocmai ca și granulocitele. Numărul monocitelor marginale este de aproximativ 3 ori mai mare decît al celor circulante.

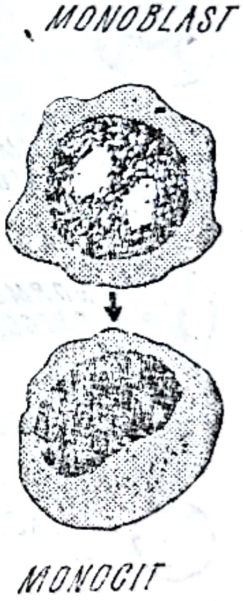


Fig. 7.34. — Schema monocitopoiezei.

7.4.5. ERITROPOIEZA (ERYTHROPOESIS)

Formarea eritrocitelor are loc în măduva hematogenă. Celula-stem multipotentă se poate diferenția în celule ale seriei granulocitare și eritrocitare. Între celula-stem pluripotentă și celulele precursoare ce nu pot fi identificate morfologic, se găsește un stadiu celular intermediar, de celule precursoare mai puțin potente, dar mai angajate *(committed)*, neidentificate pînă în prezent la microscop, dar a căror existență este demonstrată, atît pentru granulocite cît și pentru eritrocite, prin diferite tehnici funcționale și procedee experimentale. Pentru linia eritrocitară, celulele precursoare pot fi incluse în două categorii: *a)* precursorii neidentificați și *b)* precursorii identificați morfologic. Prima grupă cuprinde *celulele-stem multipotențiale (CFU-S)*, *erythroid burst forming units (BFU-E)* și *erythroid colony forming units (CFU-E)*. Grupa a doua de celule ale liniei eritrocitare, respectiv precursorii identificați morfologic, cuprinde proeritroblastele (pronormoblastele), eritroblastele (normoblastele) bazofile, eritroblastele (normoblastele) policromatofile și reticulocitele. Ultimele intră în circulația sanguină și devin eritrocite adulte.

Termenul de *eritron* cuprinde totalitatea globulelor roșii circulante și a precursorilor lor medulari. La omul adult, normal, eritronul reprezintă un sistem de continuă reînnoire, în care pierderea hematiilor senescente din sîngele periferic este înlocuită rapid și exact cu cele produse în măduva hematogenă. Dereglarea acestei balanțe se produce în stări patologice,

Scanned with OKEN Scanner

conducînd la *anemie* (scăderea numărului de hematii circulante) sau la *policitemie* (creşterea numărului de hematii circulante).

La individul normal eritronul cuprinde următoarea proporţie de celule pe kg greutate: eritroblaşte 3×10^9, eritrocite adulte 300×10^9.

Timpul lor de maturare (în zile) este următorul: 4,5 pentru eritroblaşte, 2,5 pentru reticulocitele medulare, 1—2 pentru reticulocitele circulante, 120 pentru eritrocite.

Proeritroblastul (pronormoblastul) este o celulă nediferenţiată, cu diametrul de 14—19 µm. Nucleul sferic, central este palid, bogat în cucromatină şi conţine 1—2 nucleoli mari (fig. 7.35). Citoplasma intens bazofilă este bogată în ribozomi şi reticul endoplasmic rugos; conţine multe mitocondrii, un complex Golgi dezvoltat şi doi centrioli, ultimele trei tipuri de organite celulare fiind concentrate perinuclear, într-o zonă citoplasmatică clară. Citoplasma mai conţine relativ frecvenţi lizozomi şi microtubuli. Membrana de suprafaţă prezintă invaginări care dau naştere la vezicule intracitoplasmatice încărcate cu feritină *(vezicule de rofebocitoză)*. Celula este foarte activă, desfăşoară sinteze vii de proteine care duc la creşterea volumului celular. De asemenea sinteza de hemoglobină începe în stadiul de proeritroblast. Prin diviziuni mitotice rapide proeritroblastul se transformă în eritroblast bazofil. Tot din acest stadiu celular începe şi sinteza antigenilor hematiei (A, B, H, Rh etc.).

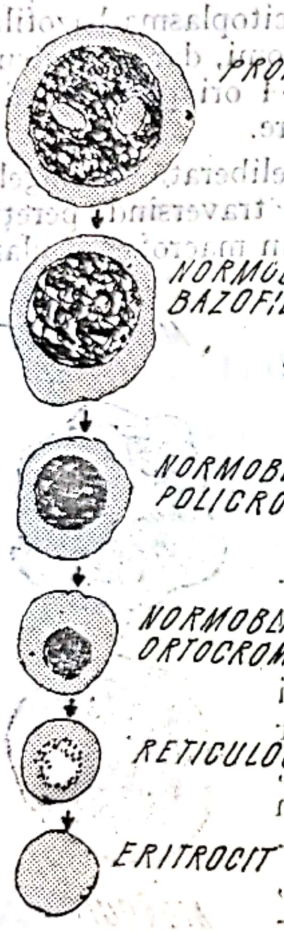


Fig. 7.35 — Schema eritropoiezei.

Eritroblastul bazofil, sau normoblastul bazofil sau stadiul precoce de eritroblast, are diametrul de 13—16 µm. Nucleul ocupă 3/4 din celulă, avînd o cromatină mai condensată. Heterocromatina şi eucromatina apar adeseori egal repartizate şi intercalate, amintind de liniile şi orele de pe cadranul unui ceas sau de spiţele unei roţi. Heterocromatina se prezintă frecvent cu forme geometrice regulate, hexagonale sau pentagonale, în număr de aproximativ 15—20, ce ating fiecare diametrul de 2 µm. Citoplasma bazofilă conţine numeroşi ribozomi şi poliribozomi, mitocondrii numeroase (20—30 într-o celulă), complex Golgi bine dezvoltat, lizozomi de talie mică, puţini microtubuli şi microfilamente. În plus, în citoplasmă apare feritina, sub formă dispersată, pe alocuri cu tendinţa de a se grupa în mici grămezi numite *siderozomi*, unii dintre aceştia înconjuraţi de membrană. Membrana celulară prezintă numeroase *vezicule de rofeocitoză*. Eritroblaştele bazofile continuă să se dividă mitotic şi să formeze hemoglobina. Ele dau naştere unor celule mai diferenţiate, care sînt eritroblaştele policromatofile.

Scanned with OKEN Scanner

Eritroblastul policromatofil, sau *normoblastul policromatofil*, sau eritroblastul intermediar, este o celulă mai mică de 12—15 µm. Nucleul, de dimensiuni mai reduse, ocupă jumătate din celulă și conține cromatină condensată, rezultată prin unirea maselor cromatiniene. Nucleolul a dispărut. În citoplasmă se acumulează hemoglobina sintetizată de celule în zone ce apar acidofile, în contrast cu celelalte bazofile (cu reticul endoplasmic rugos), ce se reduc treptat pe măsură ce celula se diferențiază și se maturează. Organitele celulare se reduc paralel cu acumularea de hemoglobină. Feritina este prezentă mai frecvent sub formă de siderozomi, adesori încapsulați. Eritroblastul policromatofil prezintă încă un număr de diviziuni mitotice, prin care va da naștere la celule cu potențial sporit de diferențiere, numite eritroblaste ortocromatice.

Eritroblastul ortocromatic, sau *normoblastul ortocromatic* sau *oxifil* sau *normoblastul picnotic* are diametrul de 8—10 µm și formă rotundă. Nucleul este mic, excentric, cu cromatina mult condensată, dîndu-i un aspect întunecat. Masa de heterocromatină apare omogenă, astructurată. Citoplasma este acidofilă datorită încărcării ei cu hemoglobină. Organitele celulare sînt rare și de dimensiuni reduse. După trei mitoze nucleul devine picnotic și este extruzionat.

Nucleul extruzionat este totdeauna înconjurat de o zonă îngustă de citoplasmă ce conține și hemoglobină învelită de o membrană, reprezentînd aproximativ 5—10% din citoplasma noului reticulocit ce ia naștere (fig. 7.36). Nucleul extruzionat este îndepărtat prin fagocitare de către macrofage.

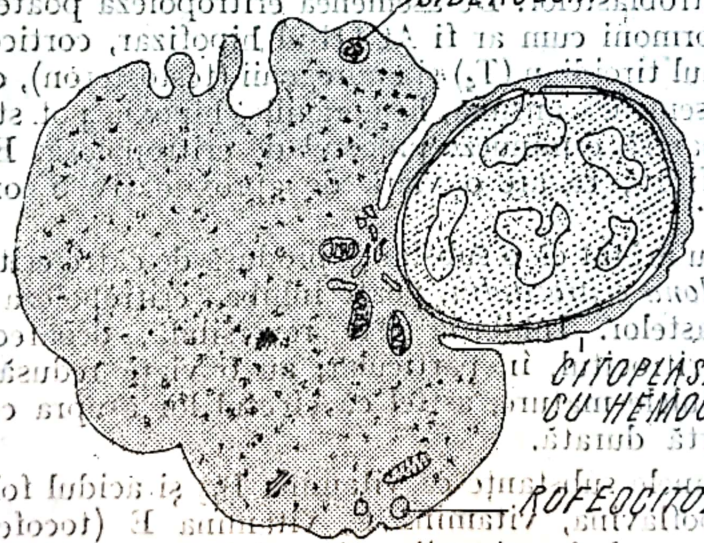


Fig. 7. 36. — Extruzionarea nucleului din eritroblastul picnotic.

Reticulocitul are diametrul de aproximativ 9 µm. Este o celulă anucleată, a cărei citoplasmă mai conține încă, în reticulocitul medular resturi de organite celulare cum ar fi 2 centrioli, mitocondrii, complex Golgi și poliribozomi. În măduvă, se maturează în 24—48 ore și înainte de a intra în circulație, reticulocitul își elimină în citoplasmă, prin contracții repetate, organitele celulare, cu excepția unor granule ribonucleoproteice al căror conținut în ARN conferă bazofilie celulei. Prin colorații postvitale cu albastru

de cresil acestea pot apărea ca granule izolate sau dispuse într-o rețea caracteristică reticulocitului.

Trecerea reticulocitelor în sîngele circulant are loc prin diapedeză, celula emițînd pseudopode ce străbat peretele capilarului sinusoid medular. Trecerea către sîngele circulant se realizează prin canale transendoteliale ce se dezvoltă în celulele endoteliale ale capilarelor sinusoide, aproape de complexele lor joncționale, în momentul tranzitului reticulocitar. În sîngele circulant, reticulocitele se află în proporție de 1—3% de eritrocite. În mod compensator creșterea numărului de reticulocite sanguine indică o stimulare a eritropoiezei, cerută de scăderea fiziologică sau patologică a eritrocitelor circulante. În aceste condiții, o funcționalitate normală medulară nu duce însă la scăderea numărului de reticulocite din compartimentul de rezervă al liniei eritropoietice în organul hemopoietic. Dacă numărul lor scade totuși în măduvă, în aceste situații de cerință periferică crescută, aceasta va duce la o eliberare crescută a reticulocitelor în sînge, fără o refacere a lor în depozitul central.

Reglarea eritropoiezei se realizează prin mai mulți factori, dintre care principalul este *eritropoietina*, o glicoproteină cu greutatea moleculară de aproximativ 45 000. Ea este secretată în principal în rinichi fie direct ca factor activ, fie ca o substanță numită *factorul eritropoietic*, care interacționează cu un alt factor aflat în serul sanguin, devenind eritropoietina.

În organismul adult o cantitate mică de eritropoietină poate fi produsă și extrarenal, în ficat sau splină. În viața intrauterină, organul principal de producere a eritropoietinei este ficatul. Eritropoietina stimulează în special formarea proeritroblastelor. De asemenea eritropoieza poate fi stimulată de acțiunea unor hormoni cum ar fi ACTH-ul hipofizar, corticosteroizii din suprarenale, hormonul tiroidian (T_4) și androgenii (testosteron), ca și de sărurile de cobalt. De asemenea anemia, hemoragiile, hipoxia pot stimula eritropoieza. Estrogenii par să diminueze procesul de eritropoieză. Eritropoietina este inactivată în ficat; ea are o viață de aproximativ 5 ore în sîngele periferic.

Date actuale au arătat că o substanță produsă de către eritrocitul însuși *in vivo*, numită *chalona eritrocitului*, poate inhiba eritropoieza prin oprirea proliferării eritroblastelor. Inhibiția este reversibilă, deoarece chalonele, în general, dar și eritrocitul, în particular, au o viață redusă după ce au fost secretate de celulele mature, astfel că efectul lor asupra celulelor-țintă proprii este de scurtă durată.

De asemenea unele substanțe ca vitamina B_{12} și acidul folic, vitamina B_6 (piridoxina), riboflavina, vitamina C, vitamina E (tocoferolul), unele minerale ca fierul, cuprul dar și unii aminoacizi sau proteine sînt absolut necesare pentru buna desfășurare a eritropoiezei.

Insulele eritroblastice, prezente în măduva hematogenă, sînt alcătuite din 1—2 macrofage dispuse în general central, înconjurate de 1—2 rînduri de eritroblaste (în total 2, 4, 8, 16 sau 32 de celule). Ultrastructural se observă că macrofagele emit prelungiri citoplasmatice subțiri ce se proiectează printre eritroblaste (fig. 7.37).

Insulele eritroblastice sînt în general situate în apropierea capilarelor sinusoidale, mai rar la distanță de acestea. Toate eritroblastele insulei se află în același grad de maturare, ceea ce lasă să se presupună că derivă dintr-o

singură celulă eritropoietică sensibilă la acţiunea eritropoietinei. Asocierea morfofuncţională macrofag/eritroblast nu este încă deplin clarificată. Se pare că macrofagul este necesar pentru a interveni în fagocitarea şi distrugerea nucleilor expulzaţi de eritroblaste, a eritroblastelor anormale, a eritrocitelor îmbătrînite sau patologice. Alte păreri aduc în discuţie posibilitatea ca macrofagele să contribuie la transferul feritinei către eritroblaste

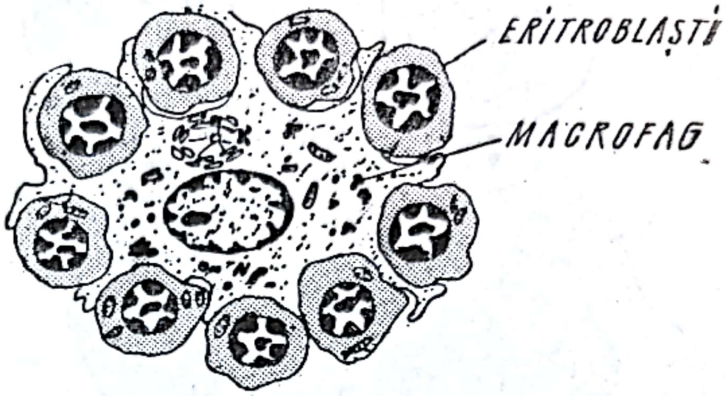


Fig. 7.37. — Insula eritroblastică.

(deşi s-a demonstrat că acestea şi-l produc singure în cea mai mare cantitate) sau că macrofagele ar influenţa într-o anumită măsură activitatea eritroblastelor.

7.4.6. TROMBOCITOPOIEZA (THROMBOCYTOPOESIS)

Trombocitele iau naştere în măduva roşie hematogenă printr-o suită celulară în diferenţiere ce alcătuieşte *seria megacariocitară*. Între celula-stem multipotenţială şi celula-stem angajată *(committed)* pentru formarea plachetelor sanguine, se găseşte un număr ierarhic de celule-stem aflate în diferite grade de diferenţiere şi de potenţial de repopulare.

Celulele-stem megacariocitare angajate (committed) au capacitatea de *self*-replicare. Ele dau naştere unor *celule precursoare diploide* care desfăşoară frecvente mitoze în momentul în care începe procesul de diferenţiere şi maturare.

Megacarioblastul este prima celulă a seriei ce poate fi identificată în măduvă. Pe măsura maturării şi a apariţiei poliploidiei, megacarioblastul prezintă trei stadii de evoluţie:

— *stadiul I sau megacarioblastul* (substadiul de 4 nuclei — tetraploidie);

— stadiul II sau *megacariocitul bazofil;*

— stadiul III sau *megacariocitul granular.*

Megacarioblastul, stadiul I, are la început mărimea unui limfocit şi prezintă reacţie pozitivă pentru acetilcolinesterază. Poate fi identificat şi imunologic, avînd antigeni de suprafaţă identici cu marea majoritate a plachetelor circulante (fig. 7.38).

Megacarioblastul (stadiul I) este o celulă angajată ce se divide activ: are forme diferite şi ploidie de 4,8 n. În celulă are loc numai divizarea nucleului, nu şi a citoplasmei, proces denumit endoamitoză (fig. 7.39).

Scanned with OKEN Scanner

Nucleul apare mare și în general parțial segmentat. Examinarea la microscopul electronic a arătat că citoplasma conține granule dense, asemănătoare celor din megacariocite și trombocite, iar membrana de suprafață prezintă invaginări și prelungiri cu ax citoplasmatic.

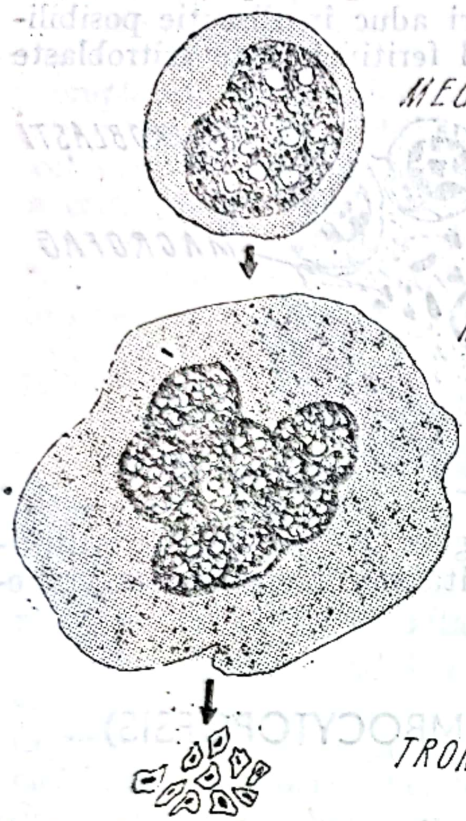


Fig. 7.38. — Trombocitopoieza.

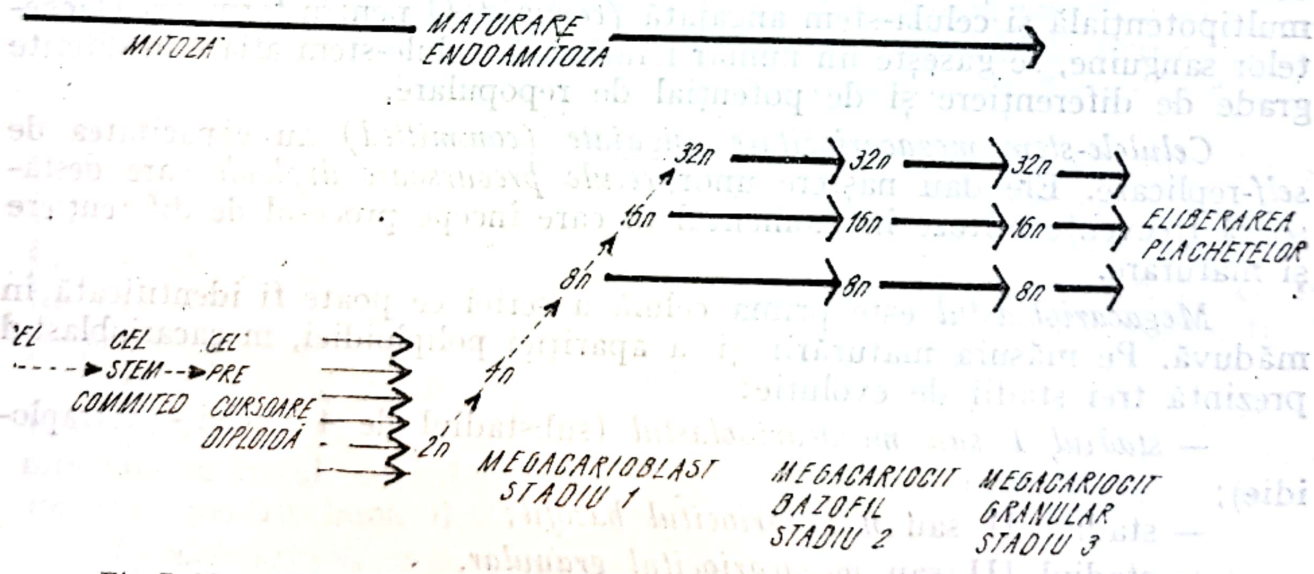


Fig. 7. 39. — Maturarea celulelor seriei megacariocitare (mitoza și endoamitoza).

Megacariocitul bazofil, stadiul II, continuă procesul de maturare dar celulele nu se mai divid. Nucleul prezintă doi nucleoli. Poliploidia este completă (4, 8, 16, rar 32 n). Încetează sinteza de ADN. Citoplasma intens bazofilă conține numeroși ribozomi, poliribozomi, un bogat reticul endoplasmic rugos și complex Golgi dezvoltat. Celula desfășoară o intensă activitate de sinteză.

Megacariocitul granular, stadiul III, reprezintă majoritatea celulelor din seria respectivă ce pot fi observate în măduva hematogenă (planșa 7.10). În citoplasmă continuă sinteza de proteine, dar pe măsură ce celula se maturează, odată și cu creșterea numărului de granule și membrane intracitoplasmatice, descrește activitatea sintetică, deci numărul de ribozomi și poliribozomi. Pe măsură ce se maturează, talia celulei crește, forma ei este ameboidală cu pseudopode lungi.

Megacariocitul trombocitogen ce derivă prin maturarea megacariocitului granular, are diametrul de 35—150 μm. Nucleul este neregulat, lobulat, cu cromatină densă și fără nucleoli. Citoplasma slab pozitivă, conține un număr mare de granule formate în complexul Golgi, ce vor realiza viitorul granulomer trombocitar. Organitele celulare apar mai reduse, în schimb sînt mai bine dezvoltate membranele netede, care vor forma la început mici canale de demarcație cu parcelarea citoplasmei. Prin unirea acestor membrane vor lua naștere membranele viitoarelor trombocite (fig. 7.40).

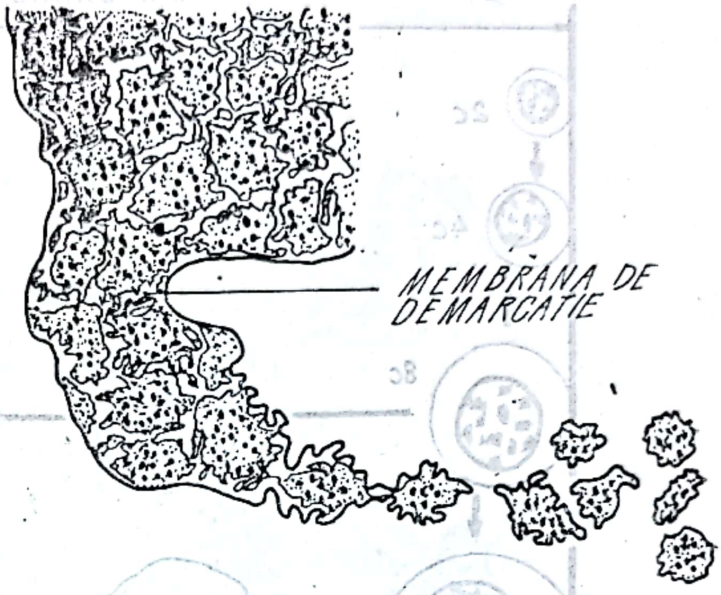


Fig. 7.40. — Demarcația teritoriilor citoplasmatice prin endomembrane și detașarea plachetelor din megacariocit.

Membrana celulară este bogată în pseudopode care conțin în axul lor citoplasmatic granule și numeroși microtubuli, orientați fie ca în hialomerul trombocitelor, fie paralel cu axul lung al prelungirilor celulare, pe care le fac rigide. În felul acesta ele pot străbate peretele sinusoidelor medulare prin spațiile intercelulare endoteliale pînă în sîngele capilar (fig. 7.41). Uneori, întreg megacariocitul poate fi observat în sinusoide, dar rar și numai în tranzit este recuperat de sîngele venos și de plămîn.

Din pseudopodele ce se proiectează în sîngele sinusoidelor medulare plachetele se eliberează prin fragmentarea acestora. Iau naștere întîi trombocite premature și apoi trombocite adevărate mature, de formă discoidală, cu benzi microtubulare marginale.

Trombocitele din sîngele periferic diferă mult între ele în ceea ce privește mărimea, caracteristicile biochimice și morfologice. În general, se observă plachete cu aspect mai dens și plachete cu aspect mai luminos. Primele au talie mai mare și sînt mai active metabolic. Aceste diferențe par a fi legate de vîrsta plachetelor sanguine (premature și mature).

Reglarea trombocitopoiezei se face de către un factor umoral numit *trombocitopoietina*, care, asemănător eritropoietinei, s-ar secreta la nivelul rinichiu-

lui. Reglarea poate fi făcută și de alți factori stimulatori nespecifici. Între aceștia, se pare că ar exista un factor reglator normal, comun pentru trombocitopoieză și eritropoieză, diferit de cel al trombopoietinei și eritropoietinei,

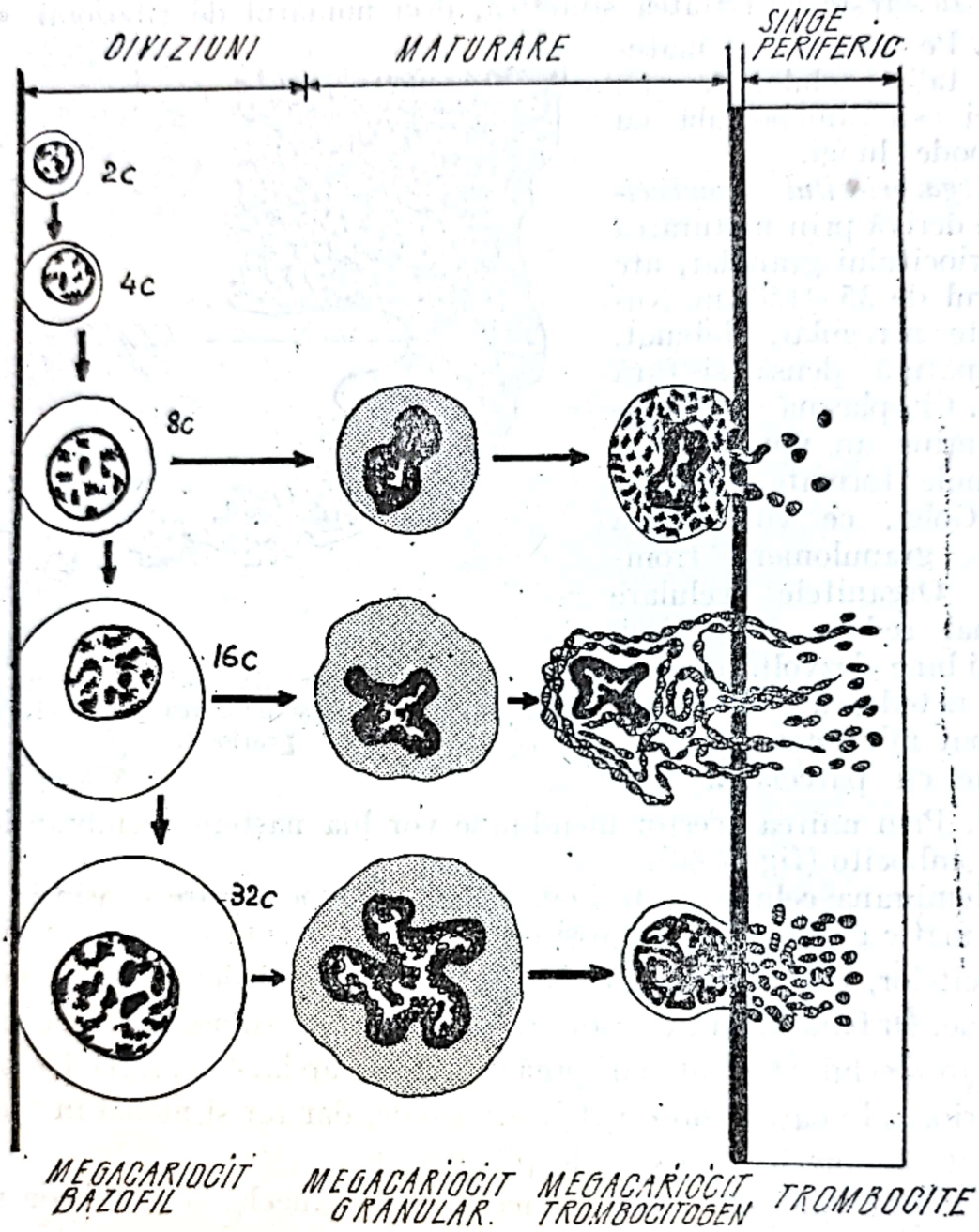


Fig. 7.41. — Schema procesului de formare a trombocitelor în măduva hematogenă și eliberarea trombocitelor în sîngele perifer ic.

care ar constitui cel de al doilea mecanism reglator „nespecific" al trombocitopoiezei.

Mielograma

Reprezintă proporția la suta de elemente figurate sanguine, a diferitelor tipuri de celule aflate în diferențiere la nivelul măduvei hematogene (fig. 7.42).

Scanned with OKEN Scanner

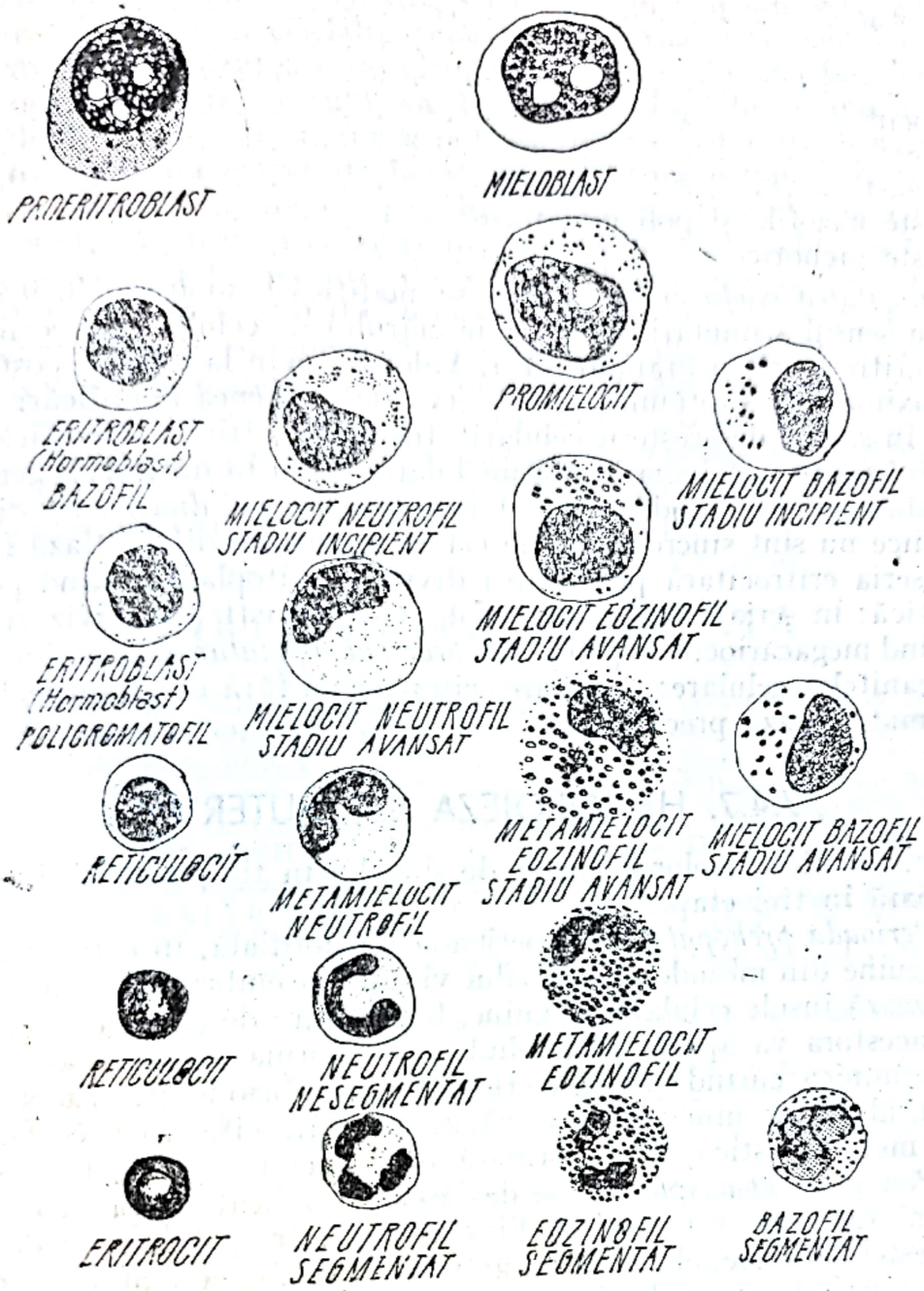


Fig. 7. 12. — Schema diferitelor stadii celulare de diferențiere a eritrocitelor și granulocitelor în măduva hematogenă.

Valorile normale pentru adulți (după Dacie și Lewis) sînt:

celule reticulare	0,1— 2
hemocitoblaste	0,1— 1
mieloblaste	0,1— 3,5
promielocite	0,5— 5
mielocite neutrofile	5— 20
mielocite eozinofile	0,1— 3
mielocite bazofile	0—0,5
metamielocite	10— 30
PMN neutrofile	7— 25
PMN eozinofile	0,2— 3

PMN bazofile	0 — 0,5
limfocite	5 —20
monocite	0 — 0,2
megacariocite	0,1— 0,5
plasmocite	0,1— 3,5
promonoblast	0,5— 5
normoblaste bazofile și policromatofile	2—20
normoblaste picnotice	2—10

Celularitatea măduvei hematogene se modifică în mod fiziologic în timpul sarcinii, în sensul stimulării creșterii numărului de celule, în special mature, din seria eritrocitară și granulocitară. Valorile revin la normal post-partum, după aproximativ 6 săptămîni. Se observă de asemenea modificări în raport cu vîrsta, în sensul descreșterii celularității către bătrînețe. Modificări puternice pot apărea în patologia locală medulară dar și în unele boli generale ale organismului. Aceste modificări intervin în *procesul divizional*: diviziunile celulelor-fiice nu sînt sincrone: unele celule mature se diferențiază fără diviziuni; în seria eritrocitară poate lipsi divizarea citoplasmei dînd poliploidie eritroblastică; în seria trombocitară pot avea loc astfel de divizări ale citoplasmei dînd megacariocite diploide. În *procesul de maturare*: anarhie de maturare a organitelor celulare; maturarea citoplasmei fără cea a nucleului; unele celule se maturizează precoce.

7.4.7. HEMOPOIEZA INTRAUTERINĂ

Formarea elementelor figurate ale sîngelui în timpul vieții intrauterine se desfășoară în trei etape:

a) Perioada prehepatică sau perioada primordială, în care apar primele celule sanguine din mezodermul sacului vitelin, la embrionul de 3 săptămîni. Se organizează insule celulare sanguine, formatoare de elemente figurate. La periferia acestora va apărea endoteliul, ce va forma primele vase sanguine, care vor comunica curînd cu vasele sanguine ale embrionului. În această primă fază, în insulele sanguine se formează numai eritrocite mari, cu nuclei (eritropoieza megaloblastică), fără formare de leucocite și plachete sanguine.

b) Perioada hepatosplenică se desfășoară în ficat și splină începînd cu a doua lună de viață intrauterină. Ficatul este principalul organ de hemopoieză al acestei perioade, el rămînînd activ pînă la cîteva săptămîni înainte de naștere. Splina este organul minor de hemopoieză în raport cu ficatul. Splina își începe activitatea odată cu ficatul și o continuă pînă la 20 de săptămîni înainte de naștere, uneori la valori reduse chiar pînă la trecerea în viața extrauterină. În splină se formează cu precădere celulele liniei eritrocitare. În perioada hepatosplenică funcționează ca organ tranzitoriu al hemopoiezei și timusul, care, pe lîngă limfocite, poate forma mielocite și eritroblaste, acestea din urmă însă în număr mic.

c) Perioada medulo-limfatică începe în a 2-a — a 3-a lună de viață intrauterină, cînd măduva hematogenă formează predominant granulocite. Din a 4-a lună de viață intrauterină funcția medulară hemopoietică este completă, asigurînd sîngelui toate tipurile de celule. În timpul acestei perioade, în apropierea momentului nașterii, foliculii limfatici ganglionari devin și ei activi, constituindu-se în organe limfopoietice. Înainte de naștere ei pot fi și slab generatori de eritrocite.

Scanned with OKEN Scanner

După naștere măduva hematogenă rămîne principalul organ al hemopoiezei. Ficatul, splina și celelalte zone hemopoietice extramedulare își încetează activitatea generatoare de elemente figurate ale sîngelui. Numai ocazional, în caz de cerere crescută, ca de exemplu după hemoragii mari sau în cazuri de hemoliză, aceste organe se pot reactiva parțial pentru o perioadă limitată și pot desfășura activitate hemopoietică. Zone ectopice de hemopoieză pot apărea și în alte organe ca: ganglioni limfatici, rinichi, suprarenale, plămîn și pleură, pancreas și chiar țesutul subcutanat al pielii sau mușchi.

Toate elementele figurate ale sîngelui se formează, după naștere, în măduva hematogenă cantonată în oasele late (stern, pelvis, corpurile vertebrelor). Cantitatea ei este identică la copil și adult, deși există diferență de greutate corporală de aproximativ 5 ori a unuia față de celălalt. La bătrîni, cantitatea de măduvă roșie hematogenă se reduce, fiind în parte înlocuită cu măduvă galbenă. Limfocitele se formează, după naștere, în măduva hematogenă în principal, dar și în țesuturile limfoide din timus, splină, ganglioni limfatici și formațiunile limfoide din tubul digestiv.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

ASKENAZE P. și colab. — Basophils und Mast Cells, *Monogr. Allergy*, 1979, 14, 222.

BAINTON B., FARQUHAR M. — Segregation and Packaging of Granule Enzymes in Eosinophils, *J. cell. Biol.*, 1970, 45, 54.

BARR R. și colab. — Hemopoietic Cells in Human Peripheral Blood; *Science*, 1975, 19, 284.

BESSIS M. — Réinterprétation des frottis sanguins. Masson et Cie, Paris, 1976.

HARDISTY R., WEATHERHALL D. — Blood and its Disorders. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, 1982.

HARRIS J., KELLERMEYER E. — Red Cell. Harvard University Press, Cambridge, 1978.

LAJTHA L. G. — Stem Cell Concepts. Differentiation 14—23, 1979.

STITES D., STOBO J. — Basic and Clinical Immunology, Lange Medical Publ., Los Altos, 1984.

TANAKA Y., GOODMAN J. — Electronomicroscopy of Human Blood Cells, Harper and Row, Philadelphia, 1972.

THOMAS D., YOFFEY J. — Human Fetal Haemopoiesis, *Brit. J. Haemat.*, 1978, 189, 964.

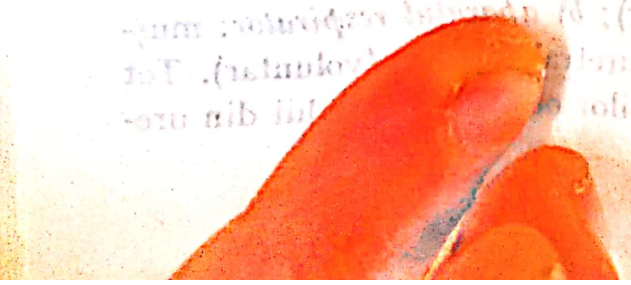
WELLER P., GOETZL E. — The Human Eosinophil, *Amer. J. Pathol.*, 1980, 100, 793.

WICKRAMASINGHE S. — Human Bone Marrow. Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, 1975.

WINTROBE M. și colab. — Clinica Hematology, Springer Verlag, Hamburg, 1974.

WOOD W. — Developmental Haemopoiesis. În: „Blood and its Disorders", Blackwell Scientific Publication Ltd., Oxford, 1982.

ZUCKER M. D. — The Functioning of Blood Platelets, *Scient.*, 1980, 242, 70.



Scanned with OKEN Scanner

ŢESUTURILE MUSCULARE

8.1. INTRODUCERE. CLASIFICARE

Ţesuturile musculare sînt alcătuite din celule specializate pentru contracţie, celule care, datorită formei lor alungite, sînt denumite uzual *fibre musculare*. Pentru o celulă a cărei sarcină funcţională primordială este contracţia, forma alungită este esenţială, deoarece o scurtare într-o anumită direcţie este mult mai eficientă la o celulă alungită decît la o celulă rotunjită cu acelaşi volum.

Pe baza caracteristicilor morfologice şi funcţionale se disting la mamifere, inclusiv la om, trei tipuri de ţesut muscular (*vide infra*): striat scheletic, cardiac şi neted (fig. 8.1). Ţesutul muscular striat scheletic este alcătuit din celule cilindrice, lungi, multinucleate care prezintă clar striaţii transversale, cînd sînt examinate la microscopul optic. Contracţia muşchilor striaţi scheletici este rapidă, puternică şi în cele mai multe cazuri controlată voluntar. Ţesutul muscular striat cardiac este prezent numai în miocard, fiind alcătuit tot din celule musculare striate, dar mononucleate şi solidarizate între ele prin structuri speciale, caracteristice, numite discuri intercalare. Contracţia muşchiului cardiac este involuntară dar viguroasă şi ritmică. Ţesutul muscular neted este alcătuit din celule fuziforme, care nu apar striate la microscop. Contracţia muşchilor netezi este lentă şi nu poate fi controlată voluntar.

8.2. ŢESUTUL MUSCULAR STRIAT SCHELETIC

Răspîndire în organismul uman. Fibrele musculare striate intră în *alcătuirea tuturor muşchilor scheletici* (*somatici*). În plus, formează în: *a) tubul digestiv*: musculatura cavităţii bucale şi faringelui, jumătăţii superioare a esofagului şi sfincterul anal extern (voluntar); *b) aparatul respirator*: muşchii laringelui; *c) aparatul urinar*: sfincterul uretral extern (voluntar). Tot muşchi striaţi sînt şi muşchii extrinseci ai globilor oculari şi muşchii din urechea medie (tabelul 8.I).

Scanned with OKEN Scanner

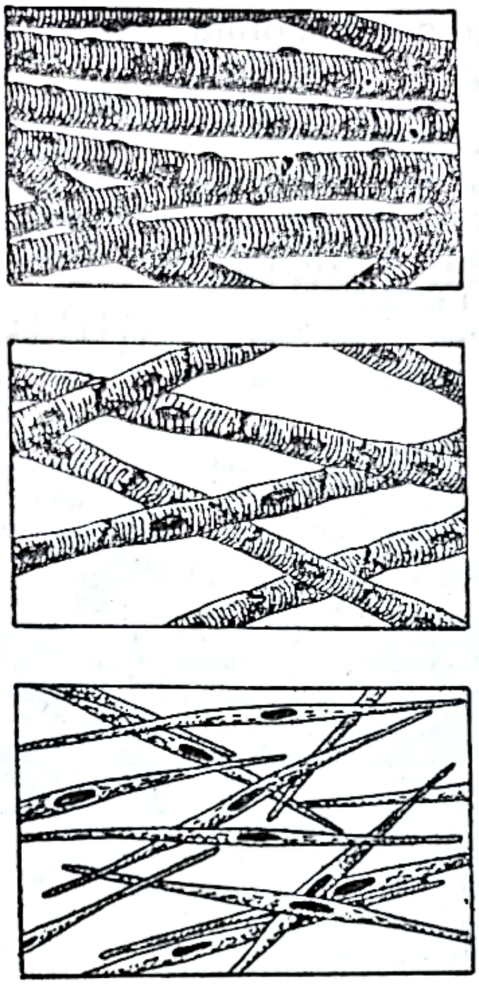


Fig. 8. 1. — Reprezentare schematică a celor trei tipuri de fibre musculare: striate (scheletice), cardiace și netede. Deși fibrele musculare scheletice și cardiace sînt tipuri striate (prezintă o alternanță de benzi clare și întunecate cînd sînt examinate la microscopul cu contrast de fază sau cu polarizație), fibra musculară striată scheletică este multinucleată, cu nucleii dispuși periferic, iar fibra musculară cardiacă este tipic uninucleată (cu nucleul central). Fibrele musculare netede, de regulă fuziforme, sînt mononucleate, dar apar „nestriate", de unde denumirea de „netede".

TABELUL 8.1

Clasificarea țesutului muscular

Morfologic		*Funcțional*
Striat	Scheletic	Voluntar (inervație somatică)
	Cardiac	Involuntar (inervație vegetativă)
Neted	Visceral și Vascular	

Scanned with OKEN Scanner

8.2.1. FIBRA MUSCULARĂ STRIATĂ SCHELETICĂ

8.2.1.1. Generalităţi. Formă, dimensiuni, dispoziţie

8.2.1.1. Forma

Forma fibrelor musculare striate scheletice este de obicei descrisă ca un *cilindru* foarte lung (fig. 8.2 a), cu capetele uşor rotunjite. Nu se ramifică. Pe secţiuni transversale, profilurile fibrelor musculare scheletice apar rotunjite sau poligonale (fig. 8.2 b).

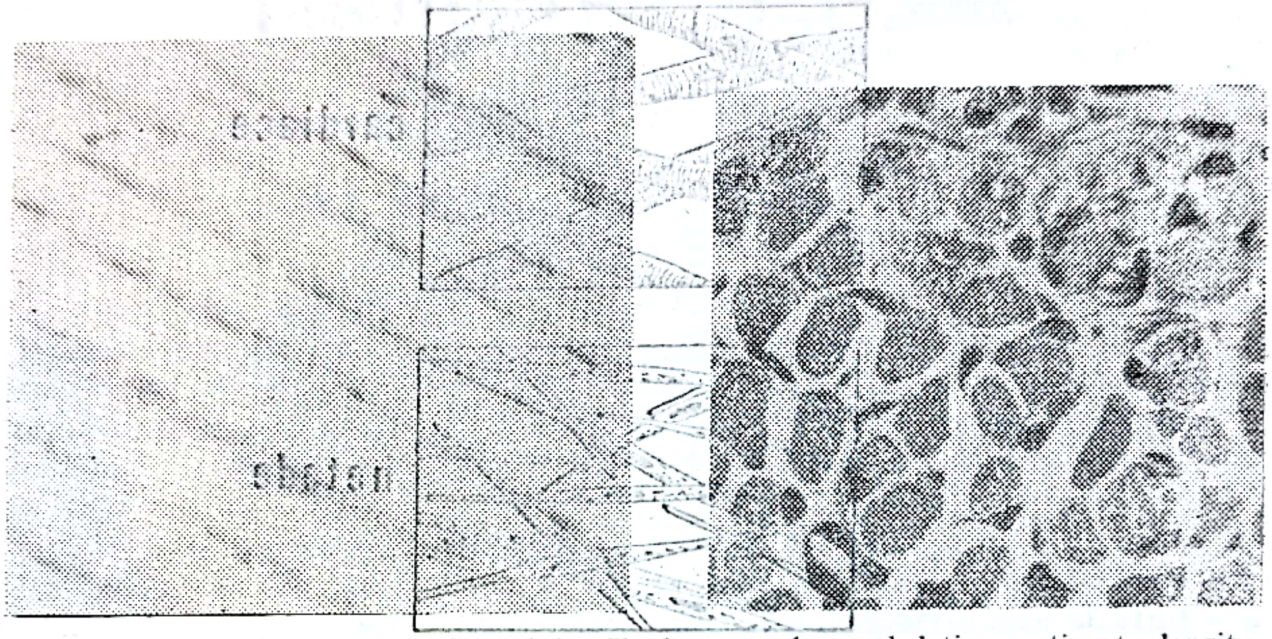


Fig. 8. 2. — Imagini de microscopie optică a fibrelor musculare scheletice secţionate longitudinal *(a)* şi transversal *(b)*. În secţiune longitudinală se remarcă striaţia transversală şi nucleii situaţi la periferia fibrei. Secţiunea transversală arată miofibrilele sub forma cîmpurilor Cohnheim şi, ocazional, în funcţie de incidenţa secţiunii, 1—2 nuclei la periferia fibrei. Printre fibrele musculare se observă ţesut conjunctiv lax (endomisiu) şi capilare sanguine.

8.2.1.1.2. Dimensiuni

În cele mai multe cazuri nu există o relaţie directă între lungimea fibrelor musculare şi lungimea unui muşchi. În majoritatea muşchilor scheletici, lungimea fibrelor musculare este mai mică decît lungimea muşchiului. De regulă, un capăt al fibrei musculare este ataşat de tendon (sau de un sept conjunctiv din interiorul muşchiului) şi celălalt este ataşat undeva, într-o formaţiune conjunctivă intramusculară.

8.2.1.1.3. Lungimea

Lungimea fibrelor musculare striate este de *ordinul centimetrilor* (de la cîţiva mm la cîţiva cm). Se citează în literatura de specialitate (Hagquist, 1960) ca „record" de lungime a unei fibre musculare la om, 35 cm, pentru lungimea unei fibre musculare din muşchiul sartorius. Lungimea fibrelor musculare striate este absolut ieşită din comun în populaţia de celule a orga-

nismului uman, în care dimensiunile medii ale celulelor sînt de cca 20 μm, iar „cea mai mare celulă", ovocitul, are numai cca 200 μm (fig. 8.3).

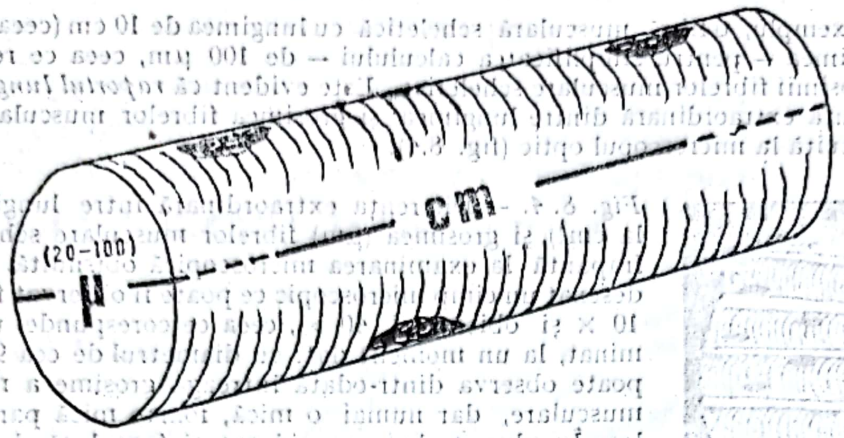


Fig. 8.3. — Reprezentare schematică a dimensiunilor fibrelor musculare scheletice la om.

Semnificația funcțională a lungimii fibrei musculare scheletice

Este general acceptat că forța unui mușchi nu depinde de lungimea fibrelor musculare, ci de numărul total de fibre din mușchiul respectiv. Teleonomic, construirea unui edificiu celular (de fapt supracelular) atît de lung, cum este fibra musculară scheletică, ar trebui să aibă o motivație evolutivă, ar trebui să procure un avantaj funcțional deosebit de important pentru a se justifica astfel, pe de o parte, complexitatea mecanismului necesar pentru realizarea megacelulei musculare scheletice, iar pe de altă parte, „dificultatea" de a întreține optim această gigantică mașinărie contractilă.

Se presupune că lungimea foarte mare a fibrelor musculare striate, în comparație cu fibrele cardiace sau netede, explică viteza mai mare de contracție a fibrelor musculare striate din mușchii scheletici.

Spre exemplu, la aceeași capacitate (procentuală) de scurtare pe unitatea de timp, cu cît o fibră musculară va fi mai lungă, cu atît viteza ei de scurtare (contracție) va fi mai mare. Din cele de mai sus rezultă că lungimea foarte mare a fibrei musculare scheletice, cu corolarul ei funcțional — viteza mare de contracție — este o cerință obiectivă, pentru că însăși existența vieții animale depinde de posibilitatea mișcării în mediu. Este de la sine înțeles că o viteză mai mare de reacție motorie în mediu a reprezentat un avantaj competitiv în evoluție.

8.2.1.1.4. Grosimea

Grosimea fibrelor musculare striate la *omul adult* este de 25 — 100 μm (tabelul 8.II), în funcție de tipul de mușchi, dar și în cadrul aceluiași mușchi variază considerabil (vezi: heterogenitatea fibrelor musculare, fibrele albe și roșii).

TABELUL 8.II

Grosimea medie (în μm) a fibrelor musculare striate la om, în funcție de vîrstă

	M. deltoideus	M. biceps	M. quadriceps	M. gastrocnemius
Nou-născut	7	7	6	6
1 an	10	10	12	16
7 ani	21	17	20	19
Adult	55	25—90	58 ± 20	70 ± 10

Raportul dintre lungimea și grosimea fibrelor musculare striate este deosebit de mare și, practic, unic printre celulele din organismul uman.

Fie, ca exemplu, o fibră musculară scheletică cu lungimea de 10 cm (ceea ce nu este neobișnuit) și grosimea — pentru simplificarea calculului — de 100 μm, ceea ce reprezintă limita superioară a grosimii fibrelor musculare scheletice. Este evident că *raportul lungime/grosime este 1 000/1*! Diferența extraordinară dintre lungimea și grosimea fibrelor musculare scheletice nu poate fi ușor intuită la microscopul optic (fig. 8.4).

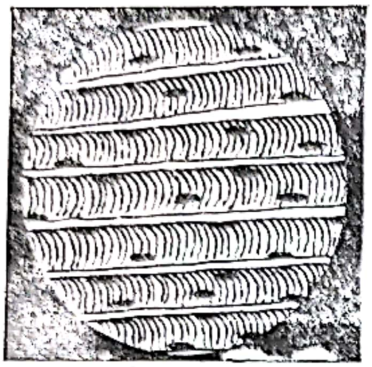


Fig. 8. 4. — Diferența extraordinară între lungimea (mm pînă la cm!) și grosimea (μm) fibrelor musculare scheletice nu apare frapantă la examinarea microscopică obișnuită. În imagine este desenat un cîmp microscopic ce poate fi observat folosind ocularul 10 × și obiectivul 40 ×, ceea ce corespunde unei arii de examinat, la un moment dat, cu diametrul de cca 900 μm. Astfel se poate observa dintr-odată întreaga grosime a mai multor fibre musculare, dar numai o mică, foarte mică parte din lungimea lor. În plus, trebuie considerat și faptul că de cele mai multe ori fibrele musculare scheletice, datorită disproporției dintre lungimea lor (cm) și grosimea secțiunii (cîțiva μm), ies din planul secțiunii și de aceea vor părea mai scurte.

Relația dintre solicitarea funcțională a unui mușchi și grosimea fibrelor sale. Este interesant de remarcat că la naștere, grosimea fibrelor musculare striate este relativ uniformă în majoritatea mușchilor scheletici: cca 6—7 μm (tabelul 8.II). Ulterior, grosimea fibrelor musculare crește cu vîrsta, diferențiat, în funcție de gradul și tipul de solicitare a diferitelor grupe de mușchi.

Prin antrenament intensiv grosimea fibrelor musculare poate crește foarte mult, rezultînd *hipertrofia* de utilizare* (amintiți-vă bicepșii boxerilor!). Invers, prin imobilizare prelungită (exemplu: în cursul tratamentului unei fracturi) fibrele musculare scheletice devin mai subțiri, se produce *atrofia de repaus*, care este o hipotrofie simplă, fără hipoplazie.

8.2.1.1.5. Dispoziția fibrelor musculare striate (Structura mușchiului scheletic ca organ)

Mușchiul scheletic ca organ este alcătuit din două componente distincte histologic: celulele musculare și țesutul conjunctiv, a cărui prezență pune în valoare și modulează contracția și asigură căi de acces pentru vascularizație și inervație. Într-un mușchi striat fibrele musculare sînt dispuse paralel, orien-

---

* *Hipertrofie* (gr. *hiper* = mai mult; *trophe* = nutriție): mărirea volumului unui organ prin mărirea volumului elementelor sale componente (exemplu: celulele). De obicei este rezultatul activității crescute în scop adaptativ sau compensator.

Hiperplazia (gr. *plassein* = a forma): mărirea unui organ prin creșterea *numărului* elementelor celulare componente.

Atrofie, involuția unei formațiuni anatomice corespunzînd scăderii activității; poate fi determinată de:

— *hipotrofie*, atrofie simplă, prin scăderea volumului celulelor;

— *hipoplazie*, atrofie *numerică*, prin scăderea numărului de celule.

Se folosește uneori termenul de *amiotrofie*, care semnifică în mod curent o atrofie musculară patologică, rezultată prin mecanism combinat: hipotrofie și hipoplazie.

Scanned with OKEN Scanner

tate pe direcția mișcării, și legate între ele prin țesut conjunctiv care formează: endomisiul, perimisiul și epimisiul (fig. 8.5). Țesutul conjunctiv al mușchiului este mai bine evidențiat dacă este examinat pe secțiuni transversale, la puteri măritoare mici.

Endomisiu. Fiecare fibră musculară este învelită de o teacă conjunctivă subțire, numită endomisiu, alcătuită în principal dintr-o rețea de fibre reticulare și din delicate fibrile de colagen. Ocazional, sînt prezente și fibroblas-

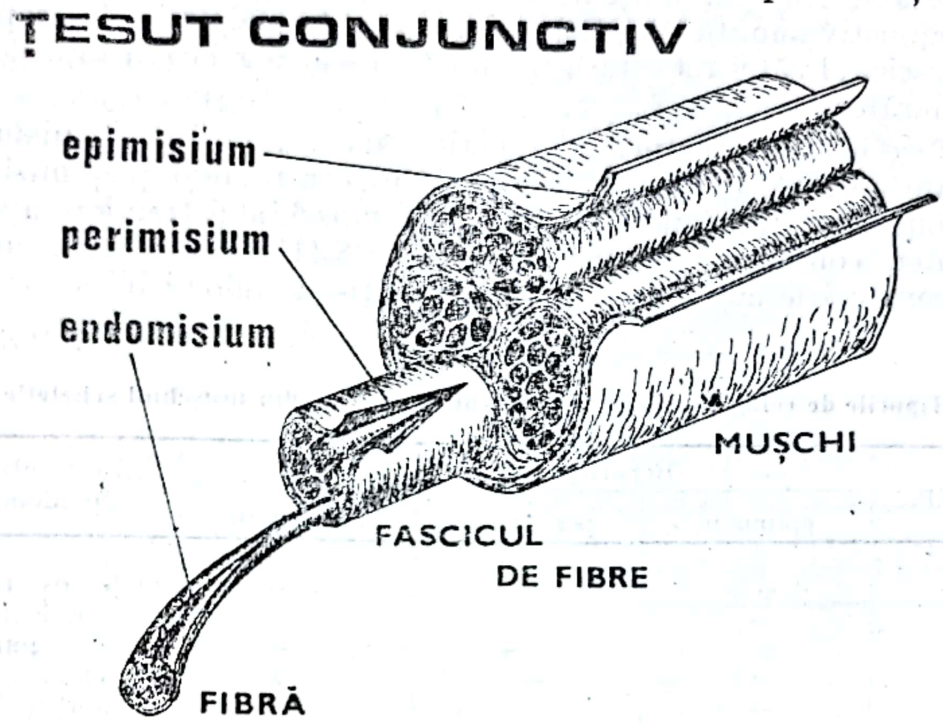


Fig. 8. 5. — Reprezentare schematică a componentelor conjunctive dintr-un mușchi scheletic: epimisiul, care învelește întregul mușchi, perimisiul, care învelește fascicule de fibre, și endomisiul, care învelește fiecare fibră musculară.

te și macrofage, cu rol important în procesele inflamatorii. În acest spațiu conjunctiv sînt cuprinse capilarele sanguine și filetele nervoase. Endomisiul nu conține capilare limfatice. Din studiile clasice ale lui Krogh se apreciază că în mușchiul striat scheletic există cam 2 000 de capilare sanguine/mm². Capilarele sanguine merg longitudinal printre fibrele musculare, dar prezintă frecvente anastomoze transverse, ceea ce realizează în fapt o rețea capilară în endomisiul fiecărei fibre musculare.

Perimisiu. Mai multe fibre musculare formează un *fascicul primar.* Cîteva fascicule primare formează un *fascicul secundar,* iar cîteva fascicule secundare formează un *fascicul terțiar* ș.a.m.d. Fasciculele pot fi observate cu ochiul liber. Fiecare fascicul muscular este învelit de o teacă conjunctivă care face parte din perimisiu (perimisiu intern). Perimisiul este mai gros decît endomisiul și este format predominant din fascicule de fibre colagene și elastice. El găzduiește arteriolele, venulele, capilarele limfatice și nervii.

Fasciculele de fibre musculare variază ca grosime în funcție de mușchi, dar în general sînt mai subțiri în mușchii implicați în mișcări fine și mai groase, în mușchii responsabili de acțiuni care necesită o forță mare.

Fasciculele de fibre musculare sînt dispuse într-o manieră caracteristică în fiecare mușchi. Această dispoziție (exemplu: dacă fasciculele sînt paralele cu tendonul sau se inseră sub un anu-

mit unghi pe tendon) este utilizată de anatomiști pentru a clasifica mușchii scheletici în cîteva tipuri cum ar fi: fuziformi, unipenați, bipenați, multipenați etc. Arhitectura fasciculară a mușchiului, realizată prin dispoziția perimisiului, este importantă pentru „puterea" mușchiului ca organ: fascicule lungi, paralele, permit un grad de scurtare mai mare, dar o forță de tracțiune mai mică. Cînd fasciculele sînt orientate oblic față de inserția conjunctivă (exemplu: ca în mușchii multipenați), gradul scurtării globale este mai mic dar forța dezvoltată de asemenea mușchi este mai mare.

Epimisiu. Întregul mușchi ca organ anatomic este conținut într-un înveliș conjunctiv numit epimisiu (perimisiu extern). Epimisiul ancorează mușchiul de fascie, al cărei rol este să permită mișcarea relativă față de structurile înconjurătoare.

Toate cele trei structuri conjunctive (endo-, peri- și epimisiu) sînt în continuitate între ele (perimisiul este legătura dintre endo- și epimisiu) cît și cu țesutul conjunctiv din structurile adiacente mușchiului (tendon, aponevroză, periost, rafeu conjunctiv, derm etc.). Tabelul 8.III arată totuși unele diferențe de compoziție moleculară între epi-, peri- și endomisiu.

TABELUL 8.III

Tipurile de colagen prezente în țesutul conjunctiv din mușchiul scheletic

Colagen tip	Repartiția în			Alte țesuturi în care predomină
	epimisiu	perimisiu	endomisiu	
I	+ + +	+	—	piele, os, tendon
II	—	—	—	cartilaj hialin
III	+	+ + +	+	vase sanguine
IV	—	—	+	placentă
V	—	—	+ + +	membrane bazale

Semnificația notațiilor: — = absent; + = prezent; + + + = abundent.

Importanța țesutului conjunctiv din mușchi. Deși spațiul conjunctiv din tr-un mușchi striat scheletic ocupă numai cca 10% din volumul mușchiului ca organ, dispoziția particulară a țesutului conjunctiv care compartimentează mușchiul, facilitează și nuanțează funcția contractilă a mușchiului ca organ, deoarece grupe de fibre (fascicule) se pot contracta independent. Prezența componentei conjunctive intramusculare nu are numai semnificația stabilirii legăturilor dintre fibre ci și un rol important în reglarea și integrarea contracției mușchiului striat scheletic. Deși este știut că fiecare fibră musculară în parte se comportă conform legii „tot sau nimic", cu cît un mușchi striat conține printre fibrele sale o atmosferă conjunctivă mai abundentă, cu atît este, bineînțeles, sub control nervos, mai capabil de o gradare a activității sale contractile.

Tăria (duritatea) la palpare a unui mușchi depinde de cantitatea de țesut conjunctiv prezent printre fibrele sale. Se consideră că mușchiul scheletic care conține cel mai puțin țesut conjunctiv este mușchiul psoas. De aceea el este preferat ca material de cercetare de către biochimiști (este mai ușoară omogenizarea țesutului în vederea fracționării celulare) și este renumit printre gurmanzi ca „filet mignon".

Scanned with OKEN Scanner

8.2.1.2. Structura și ultrastructura fibrei musculare scheletice

Fibra musculară striată scheletică este o celulă foarte specializată*, care, din punct de vedere al organizării sale ultrastructurale, se abate mult de la modelul obișnuit al celulei idealizate. Hiperspecializarea morfofuncțională a fibrei musculare striate scheletice este reflectată, spre exemplu, de faptul că o astfel de fibră este adaptată pentru a produce lucrul mecanic echivalent la de 1 000 de ori mai mult decît propria ei greutate și totodată este capabilă să se contracte de 100 de ori sau mai mult pe secundă.

Într-o descriere tradițională citologică, se pot enumera următoarele componente ale unei fibre musculare striate scheletice: *a*) învelișul celular (sarcolema); b) nucleii și *c*) sarcoplasma, alcătuită din matrice citoplasmatică, în care se găsesc organite comune, incluziuni și organite specifice (miofibrilele și reticulul sarcoplasmatic).

Tabelul 8.IV arată volumul ocupat de diferitele componente subcelulare într-o fibră musculară scheletică de om.

TABELUL 8.IV

Volumul unor componente celulare exprimat procentual față de volumul total al fibrei musculare striate scheletice la om*

Componenta celulară	Volumul ocupat (procente din volumul total al fibrei)
Nucleii	1
Miofibrilele	80—86
Mitocondriile	3—6
Sistemul T	0,15—0,30
Reticulul sarcomplasmic	1,5—3,5
Granulele lipidice	0,20—0,60

* Datele sînt prelucrate după B. Eisenberg (1982). Variațiile volumului ocupat de diferite componente celulare reflectă, înainte de orice, varietatea tipurilor de fibre musculare striate scheletice la om (vezi heterogenitatea fibrelor musculare striate).

8.2.1.2.1. Învelișul celular (sarcolema)

Inițial, termenul de *sarcolemă* (introdus de Bowmann în 1840) era folosit pentru a denumi învelișul fibrelor musculare. Microscopia electronică a evidențiat însă faptul că acest înveliș are o ultrastructură complexă (fig. 8.6), în care se disting de la interior la exterior (fig. 8.7): *sarcolema propriu-zisă* (membrana celulară propriu-zisă), formată din plasmalemă cu glicocalix, și așa-numita *membrană bazală* **, de fapt matrice pericelulară prin excelență, alcătuită, la rîndul ei, din lama bazală și lama reticulată.

* Prefixul „mio" sau „sarco" (gr. = carne) este adesea folosit pentru a defini unele componente ale celulelor musculare. Astfel: sarcolema este membrana celulară (plasmalema), sarcozomi sînt mitocondrii, sarcoplasma este citoplasma, reticulul sarcoplasmic este reticulul endoplasmic etc.

** Folosirea termenului *membrană bazală* pentru fibrele musculare este din punct de vedere strict semantic incorectă, deoarece fibrele musculare nu au o bipolaritate funcțională ca cele epiteliale. Dar utilizarea este atît de răspîndită, încît aparent nu poate fi stopată.

Scanned with OKEN Scanner

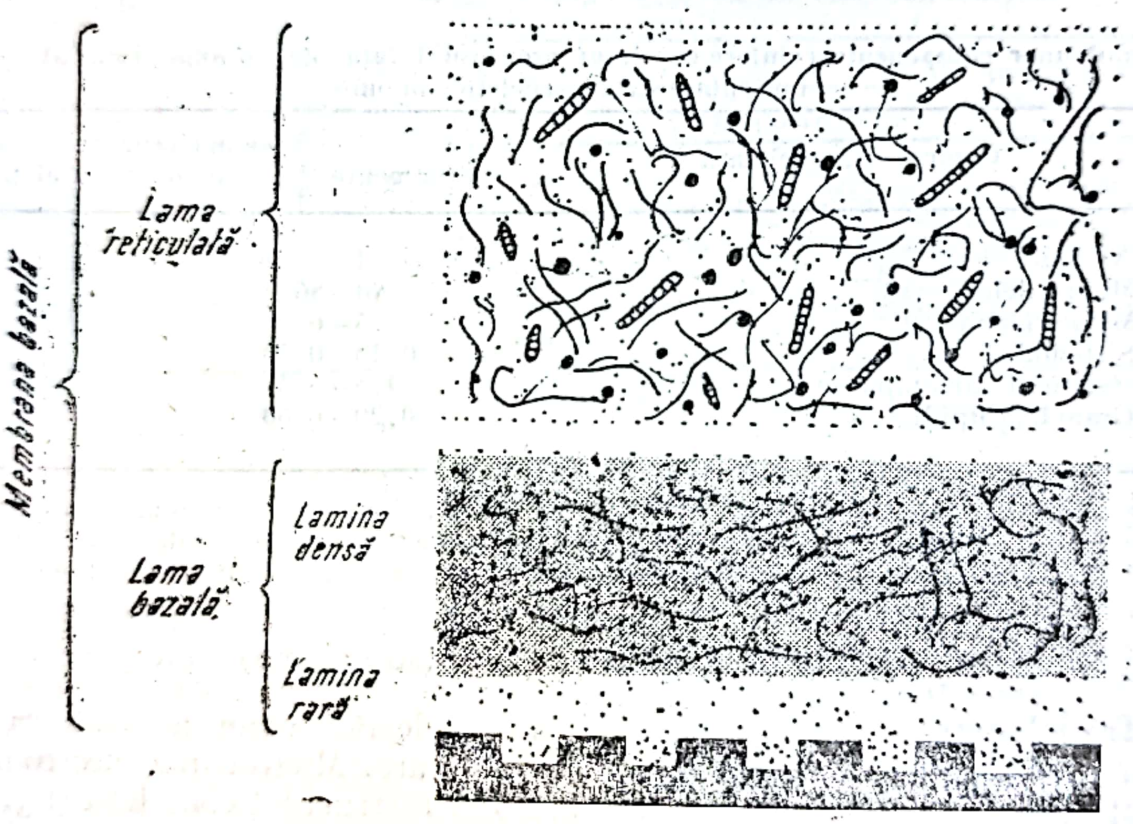


Fig. 8.7. — Schema alcătuirii ultrastructurale a învelișului fibrei musculare striate. A se compara cu imaginea reală electronomicroscopică din figura 8.6.

Lama bazală este formată din două substraturi: *lamina rara* electronotransparentă, cu grosime de 2—5 nm, situată între glicocalix și *lamina densa*, electronodensă, cu grosime de cca 10 nm, ce conține colagen de tip V (vezi și tabelul 8.III). *Lama reticulată* este situată deasupra *laminei densa* și este în ultimă instanță matrice extracelulară amorfă, conținînd fibrile striate și netede și granule bogate în glicozaminoglicani. Această structură se continuă pe nesimțite cu endomisiul.

Scanned with OKEN Scanner

Sarcolema propriu-zisă

Sarcolema are grosimea de cca 9 nm, și, din punct de vedere ultrastructural, apare trilaminată, cu două straturi osmiofile — intern și extern — și un strat osmiofob mijlociu. Ca organizare supramoleculară sarcolema fibrei musculare scheletice pare să se conformeze și ea modelului mozaic proteic într-un fluid lipidic bidimensional. Cercetări recente au permis izolarea și caracterizarea unor proteine sarcolemale transmembranare (integrale) extrem de importante funcțional, cu rol de *canale ionice* (exemplu: canalul pentru Na^+, operat electric) sau de *pompe ionice* (exemplu: pompa de Na^+, pompa de extrudzie a Ca^{2+} etc.).

Ecto-enzimele sarcolemale: posibile implicații medicale. Ecto-enzimele sarcolemale sînt enzime care își exercită acțiunea pe versantul extracelular al sarcolemei, avînd centrul activ localizat în ectodomeniul moleculei proteice transmembranare. Cel puțin trei asemenea ecto-enzime au fost identificate în sarcolema fibrei musculare striate: ecto-ATP-aza, adenilat-kinaza și 5'-nucleotidaza. Ecto-ATP-aza scindează ATP extracelular; ea este activată de concentrații mari de Ca^{2+}, în domeniul milimolar, caracteristice spațiului extracelular și *nu* are rol în transportul transsarcolemal al Ca^{2+}. Prin prezența celor trei ecto-enzime amintite suprafața ectosarcolemală realizează o secvență de reacții de tipul: ATP → ADP → AMP → adenozină + P_i, de unde rezultă un rol esențial în reglarea concentrației extracelulare de ATP și adenozină, ambele substanțe, dar mai ales adenozina, fiind vasodilatatoare puternice. În plus, adenozina este inhibitor al agregării plachetare, în timp ce ADP-ul este un puternic inductor al agregării plachetare. Dat fiind că țesutul muscular scheletic reprezintă mai mult de jumătate din țesuturile moi ale organismului, probabil că ecto-enzimele sarcolemale sînt (in)direct responsabile de controlul concentrației normale plasmatice foarte scăzute de ATP, aproximativ 1 μM (ATP-ul în soluție este un anion relativ nepermeant prin membranele biologice).

Mușchiul scheletic este un caz particular din punct de vedere al posibilelor traumatisme, hipoxii tranzitorii sau stări ischemice, condiții în care aportul de O_2 este (mult) sub necesarul local de O_2. În astfel de condiții ATP-ul și adenozina sînt eliberate din fibrele musculare scheletice, ceea ce ajustează probabil debitul sanguin local la nevoile metabolice ale țesutului. S-a sugerat chiar (Traus și colab., 1980) că faza ireversibilă a șocului traumatic ar putea fi declanșată de creșterea concentrației plasmatice de ATP și adenozină, ca urmare a depășirii capacității hidrolitice a ecto-enzimelor sarcolemale.

Din punct de vedere ultrastructural, odată cu sarcolema trebuie descriși tubii T, invaginații ale sarcolemei, și caveolele asociate sarcolemei.

Tubii T. Sarcolema se extinde, penetrează în interiorul fibrei musculare scheletice, sub forma unor invaginații tubulare numite tubi transverși sau tubi T. Denumirea provine de la faptul că direcția acestor tubi este perpendiculară, cel puțin în segmentul lor inițial, pe sarcolemă. Totalitatea tubilor T se denumește colectiv sistem T (sistem tubular transvers). Rolul sistemului T este esențial în declanșarea contracției (cuplarea excitație-contracție), prin conducerea potențialului de acțiune de la suprafața fibrei (sarcolemă) în interiorul fibrei, pînă în vecinătatea reticulului sarcoplasmatic, de unde se eliberează Ca^{2+} care declanșează contracția (vezi reticulul sarcoplasmic și cuplarea excitație-contracție).

Scanned with OKEN Scanner

Notă istorică. Se atribuie descoperirea sistemului T lui Porter și Palade (1957). Este necesară însă o precizare, de aceeași natură cu cea făcută de Porter în legătură cu descoperirea reticulului sarcoplasmic. În 1961, Porter scria: „Observațiile și descoperirile cercetătorilor mai vechi sînt frecvent uitate și chiar descoperite ca noi". Mai departe, Porter atrăgea atenția că de fapt Veratti (cercetător italian), pe baza unui studiu publicat în 1902, ar trebui considerat descoperitorul reticulului sarcoplasmic.

Doi oameni de știință români, Athanasiu și Drăgoi, ar trebui considerați ca precursori ai conceptului actual despre tubii T (vezi I. Diculescu, 1980). În 1910, Athanasiu și Drăgoi scriau: „Substanța contractilă a fibrei musculare striate ne apare străbătută în sens transversal de o serie de strii intermediare în continuitate cu sarcolema"(!).

La mamifere, inclusiv la om, tubii T se formează din sarcolemă exact la nivelul corespunzător jonctiunii dintre banda I și banda A (vezi bandarea miofibrilelor și fig. 8.8). La batracieni, tubii T se găsesc însă exact în dreptul

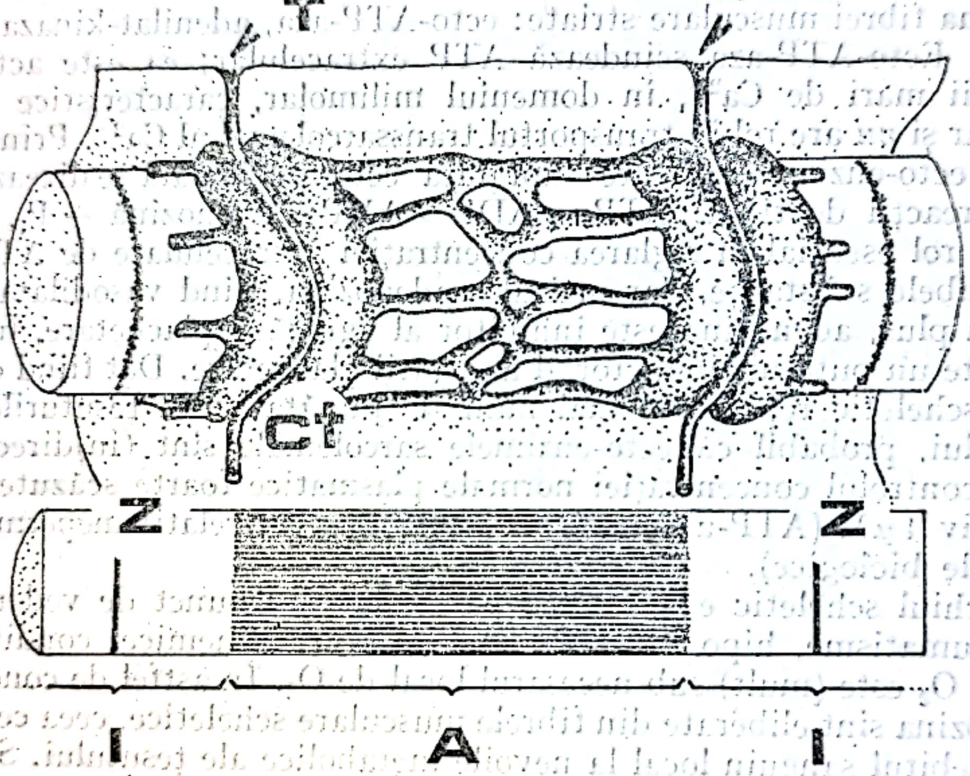


Fig. 8.8. — Reprezentare schematică a unui fragment dintr-o fibră musculară scheletică de mamifer. Sarcolema și miofibrilele sînt reprezentate secționat, pentru claritate. Se remarcă următoarele: tubii T apar ca invaginații ale sarcolemei, precis la nivelul limitei dintre banda A și banda I, ceea ce înseamnă cîte un dublet de tubi T pentru fiecare sarcomer; tubii T sînt asociați strîns cu cisternele terminale *(ct)* ale reticulului sarcoplasmic, formînd triade.

benzilor Z (fig. 8.9 a și b), lucru care nu trebuie omis în interpretarea rezultatelor electrofiziologice. Motivația funcțională pentru varietatea de localizare a tubilor T în raport cu bandarea miofibrilelor, la diferite specii, nu este cunoscută. Lumenul tubilor T comunică liber cu spațiul extracelular, fapt demonstrat prin penetrarea *marker*-ilor extracelulari în interiorul sistemului T. De aceea, conținutul tubilor T este, în ultimă instanță, spațiul extracelular pătruns în interiorul fibrei musculare. Ocazional, se poate surprinde electronomicroscopic deschiderea tubilor T la suprafața fibrei (fig. 8.10).

Scanned with OKEN Scanner

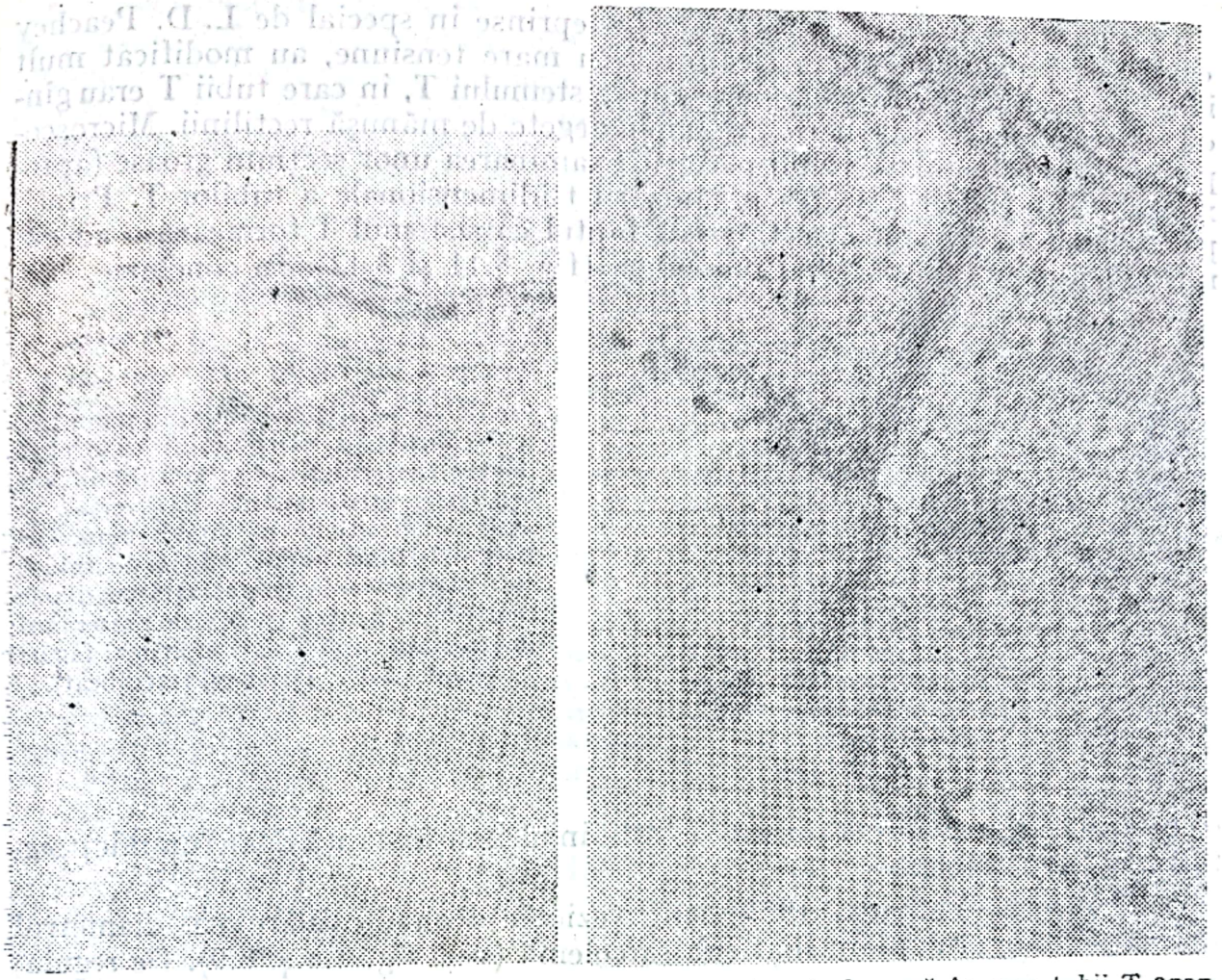


Fig. 8. 9. — Imagini electronomicroscopice. Mușchi sartorius de broască în care tubii T apar localizați caracteristic la nivelul benzilor Z:
a — secțiune longitudinală printr-un tub T în apropierea sarcolemei; *b* — secțiune transversală prin doi tubi T flancați de elemente ale reticulului sarcoplasmic (cisterne terminale).

Fig. 8. 10. — Imagine electronomicroscopică care arată continuitatea sarcolemei cu un tub T (deschiderea unui tub T în spațiul extracelular). Mușchi diafragmatic de șobolan (imagine din colecția prof. I. Diculescu).

Cercetări din ultimii zece ani, întreprinse în special de L. D. Peachey cu ajutorul unui microscop electronic cu mare tensiune, au modificat mult ideea convențională din anii '60 asupra sistemului T, în care tubii T erau gîndiți și reprezentați schematic ca simple degete de mănușă rectilinii. Microscopia electronică cu mare voltaj permite examinarea unor secțiuni groase (aproximativ 1 μm), deci sesizarea organizării tridimensionale a tubilor T. Principala achiziție a acestor cercetări este faptul că sistemul T formează o adevărată rețea în interiorul fibrei musculare (fig. 8.11 și 8.12). În concluzie, ceea

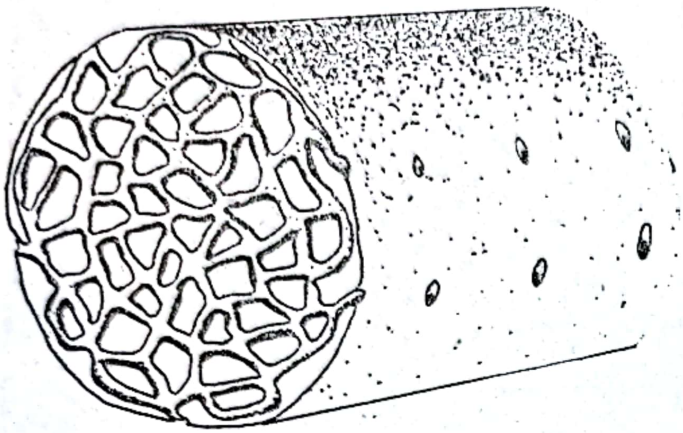


Fig. 8. 11. — Reprezentare, în mare parte idealizată, a sistemului T ca o rețea relativ neregulată de tubi ramificați, orientați predominant transversal pe axul longitudinal al fibrei musculare striate. Dimensiunile rețelei de tubi T sînt exagerate în comparație cu diametrul fibrei, pentru claritatea prezentării; în realitate tubii T sînt mult mai înguști (după L.D. Peachey, modificat).

ce se consideră uzual a fi un tub T, este în ultimă instanță doar (un mic) segment al unei rețele.

Caveolele (Yamada, 1955) sînt vezicule rotund-ovalare cu diametrul de cca 100 nm, situate imediat sub sarcolemă (vezi fig. 8.6 și 8.9). De regulă,

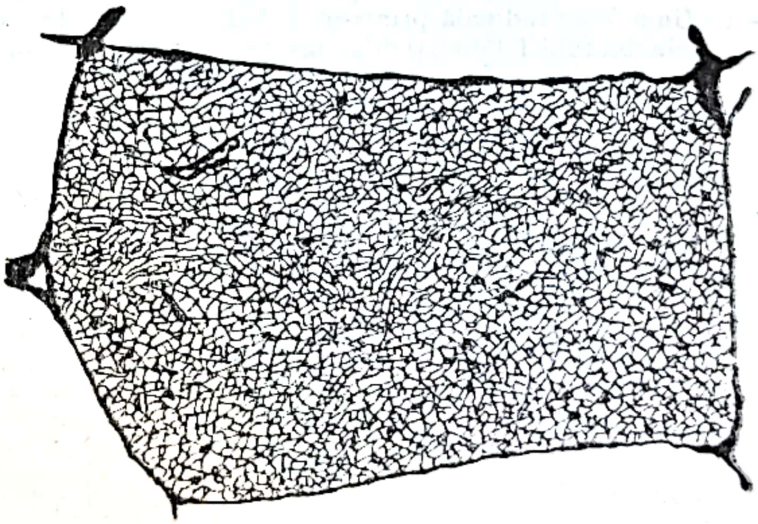


Fig. 8. 12. — Rețeaua de tubi T vizibilă într-o secțiune transversală printr-o fibră musculară striată cu ajutorul microscopului electronic cu mare tensiune. Liniile negre, fine, din interiorul fibrei reprezintă tubii T. Pentru cea mai mare parte a secțiunii rețeaua de tubi T pare neregulată, dar nu anizotropică. Mărire 1 400 (după L.D. Peachey).

ele sînt aliniate subsarcolemal într-un singur șir (7—15 caveole) dar există și separate. Compartimentul caveolar comunică cu spațul extracelular. Ocazional, s-au putut observa astfel de comunicări reprezentate printr-un canal îngust de cca 17 nm. Deși numărul caveolelor este relativ mare (3×10^9 caveole/cm^2 de suprafață sarcolemală), funcția lor nu este încă cunoscută. Oricum, aceste caveole nu sînt implicate în pinocitoză, deoarece *mar-*

Scanned with OKEN Scanner

ker-ii electronoopaci extracelulari pot pătrunde în lumenul caveolelor dar nu intră mai departe, în interiorul fibrei. Caveolele asociate sarcolemei fibrei musculare scheletice sînt asemănătoare, dar în nici un caz identice cu caveolele (veziculele de suprafață sau microveziculele de suprafață) prezente în periferia fibrei musculare netede (vezi fibra musculară netedă).

8.2.1.2.2. Nucleii

Număr. Fibra musculară striată scheletică poate avea *sute* de nuclei! În general, se admite că ar exista 20—40 de nuclei/cm lungime. Trebuie remarcat faptul că deși fibra musculară scheletică are sute de nuclei, ei nu ocupă decît mai puțin de 1% din volumul fibrei! Situația este un paradox total: singura celulă din organismul uman normal care conține sute de nuclei, dar volumul ocupat de acești nuclei din volumul total al fibrei este mult mai mic decît volumul ocupat de un nucleu obișnuit într-o celulă obișnuită (exemplu: nucleul ocupă de regulă mai mult de 5—6% din volumul celulei, de cele mai multe ori între 10 și 15%).

Se pare că un număr (mic?) dintre nucleii vizibili la microscopul optic în periferia fibrei musculare scheletice nu aparțin acesteia, ci așa-numitelor celule-satelite*. Există în literatura de specialitate aprecieri cantitative foarte diferite — între circa 30% și cîteva procente — asupra prezumtivei contribuții a nucleilor celulelor-satelite la numărul de nuclei atribuit fibrelor musculare scheletice. Oricum, se pare că această „contribuție" a celulelor-satelite ar descrește cu vîrsta.

Semnificația multinuclearității. Fibra musculară striată scheletică este în ultimă instanță o unitate supracelulară, de natură sincințială ** și nu plasmodială. Multinuclearitatea fibrei musculare scheletice este probabil soluția naturală imperios necesară în evoluție pentru a cîștiga megadimensiuni celulare.

Numărul mare de nuclei dintr-o fibră musculară scheletică nu trebuie considerat ca o risipă de material genetic. Următorul calcul ar putea fi edificator în acest sens.

Fie ca prototip celular, o celulă oarecare, de formă rotund-ovalară, cu diametrul de 20 μm. Volumul său va fi de circa 4 000 μm^3. Deci am putea considera că un nucleu este în genere apt să comande și să controleze optim un spațiu celular de circa 4 000 μm^3. Dacă vom compara o fibră musculară scheletică cu un cilindru cu diametrul de 20 μm, știind că există 40 de nuclei pentru fiecare centimetru de lungime, rezultă că cei 40 de nuclei corespund unui volum celular de 3 milioane μm^3. Dar aceasta reprezintă un nucleu pentru circa 75 000 μm^3, adică un efort spațial pentru un nucleu de fibră musculară scheletică de circa 20 de ori mai mare decît pentru un nucleu într-o celulă considerată prototip. Probabil că acest efort este posibil tocmai din cauza superspecializării morfofuncționale a fibrei musculare scheletice.

---

* *Celulele-satelite* sînt celule mici, alungite, turtite, care ocupă depresiuni situate pe suprafața fibrei musculare scheletice. Ele sînt acoperite de lamina bazală a fibrei musculare scheletice. Limitele dintre periferia fibrei musculare scheletice și celulele-satelite nu pot fi distinse cu puterea de rezoluție a microscopului optic.

** *Sincițiu*: formațiune multinucleată rezultată prin fuziunea mai multor celule inițial separate.

Plasmodiu: formațiune multinucleată rezultată din diviziuni nucleare repetate, fără diviziuni citoplasmatice.

Scanned with OKEN Scanner

Așezare. Nucleii sînt dispuși periferic, sub sarcolemă, și paralel cu axul lung al fibrei. De obicei au o dispoziție alternă. Strict practic, poziția periferică a nucleilor din fibra musculară striată scheletică este un criteriu important de diagnostic diferențial microscopic între fibra musculară scheletică și cea cardiacă, ambele fiind striate. Dispoziția periferică a nucleilor este mai ușor de surprins pe secțiuni transversale. În mod normal situarea reală a nucleilor în zonele centrale ale fibrelor musculare scheletice nu depășește 3% din totalul nucleilor.

Formă, dimensiuni, aspect microscopic. Nucleii fibrei musculare scheletice sînt ovoizi, alungiți în direcția lungimii fibrei și au 8—10 μm lungime. Heterocromatina este de regulă dispusă periferic, spre învelișul nuclear și sînt vizibili 1—2 nucleoli. De regulă, există concentrări de nuclei în fibra musculară scheletică, în vecinătatea plăcii motorii și a joncțiunii miotendinoase. Nu par să existe trăsături citologice posibil de identificat la microscopul optic sau electronic, care să fie caracteristice nucleilor din fibrele musculare scheletice comparativ cu nucleii din alte tipuri din fibre musculare sau celule.

Sarcoplasma

Sarcoplasma fibrei musculare scheletice corespunde citoplasmei altor tipuri celulare și se poate defini ca fiind conținutul fibrei, exclusiv nucleii.

8.2.1.2.3. Organite comune și incluziuni

Mitocondriile * sînt relativ numeroase în fibrele musculare scheletice umane (tabelul 8.V), ceea ce apare de la sine înțeles dacă ținem seama de faptul că ele sînt principalii furnizori de ATP necesar contracției (fig. 8.13). Mitocondriile din fibrele musculare scheletice au o densitate de criste destul de mare.

TABELUL 8.V

Conținutul de mitocondrii (procente din volumul fibrei) în fibrele musculare scheletice la om (după Hoppeler și colab., 1973) și localizarea lor intracelulară

Mitocondrii	Bărbat neantrenat	Bărbat antrenat	Femeie
totale	5,19±0,66	7,32±0,89	4,08±0,50
centrale	4,96±0,61	6,57±1,0	3,97±0,34
periferice	0,25±0,04	0,74±0,42	0,11±0,15

Mitocondriile sînt dispuse în șiruri discontinue, printre și paralel cu miofibrilele. Majoritatea mitocondriilor intermiofibrilare sînt localizate la nivelul benzii I, adiacent striei Z.

În afară de localizarea preponderent intermiofibrilară, se mai găsesc mitocondrii și periferic, sub sarcolemă, precum și în vecinătatea polilor nu-

* În literatura pre-electronomicroscopică se folosea frecvent termenul de „sarcozomi". Actualmente, deoarece nu au fost evidențiate particularități (semnificative) ale mitocondriilor din fibra musculară scheletală față de alte mitocondrii, folosirea acestui termen s-a restrîns din ce în ce mai mult.

Scanned with OKEN Scanner

cleari. În toate aceste cazuri mitocondriile sînt orientate paralel cu axul longitudinal al fibrei.

Modificări ale topografiei intracelulare a mitocondriilor din fibrele musculare scheletice sînt descrise frecvent în patologia musculară umană.

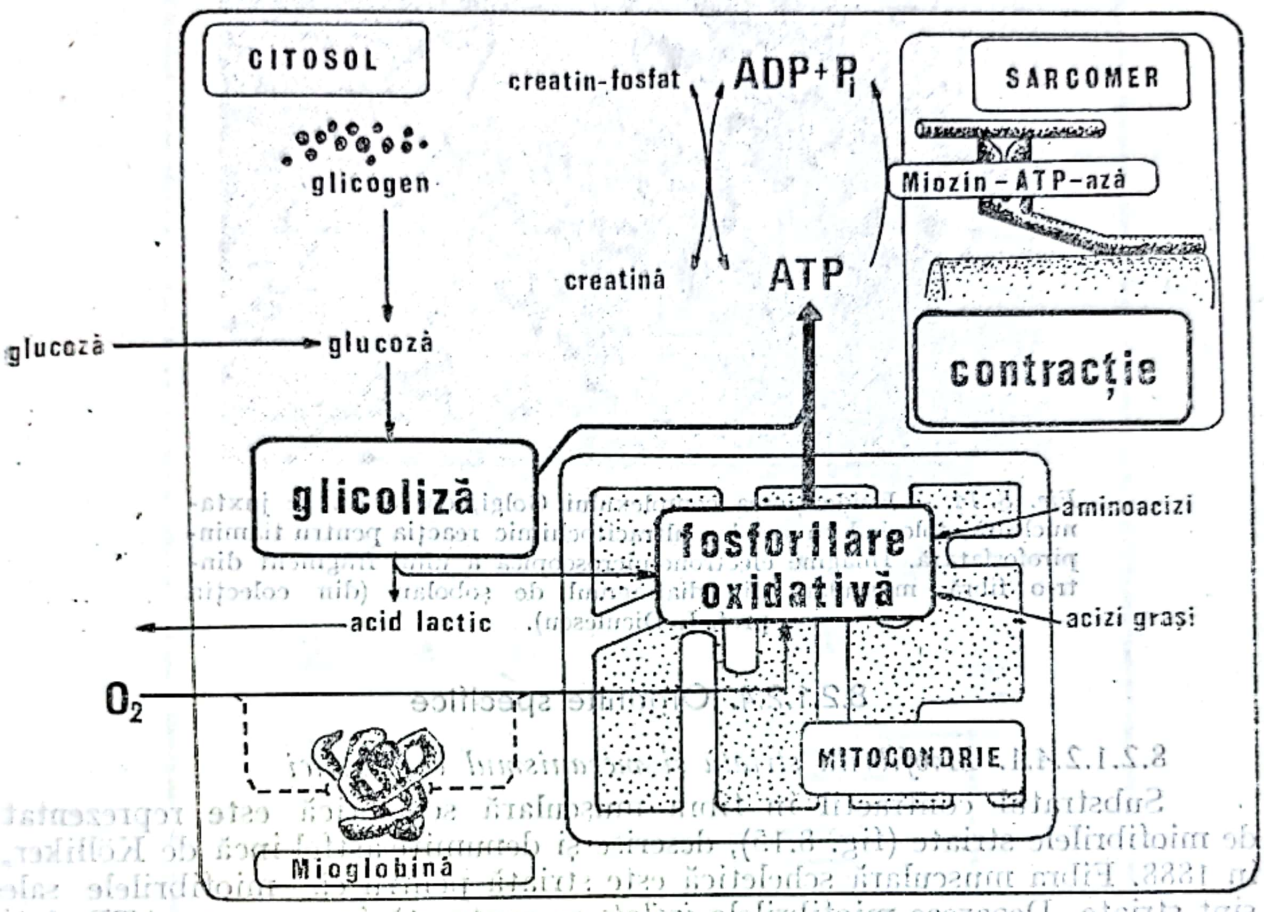


Fig. 8. 13. — Căile metabolice care produc energie (ATP) pentru contracția mușchilor scheletici. În cazul unei activități musculare reduse, ATP-ul este produs aerob, grăsimile (acizii grași) fiind combustibilul preferat. La eforturi musculare mai mari, glicoliza și rezervele locale de glicogen devin principalele materiale utilizate.

Spre exemplu, creșterea numărului mitocondriilor subsarcolemale apare în cazul neuropatiilor periferice.

Alte organite comune. În fibra musculară scheletică *zona Golgi* este reprezentată de numeroase, dar mici complexe Golgi, situate în vecinătatea nucleilor, la unul din polii nucleari (fig. 8.14). I. Diculescu a prezentat recent (1980) dovezi ultracitochimice care sugerează că aparatul Golgi din fibrele musculare scheletice, ca și în alte celule, este implicat în reciclarea membranelor (fluxul de endomembrane). *Lizozomii* sînt observați uzual juxtanuclear. Fibrele musculare scheletice au cantități neglijabile de *reticul endoplasmic rugos*, ceea ce este în acord cu lipsa „exportului" de proteine din fibrele musculare scheletice.

Incluziuni sarcoplasmice. Granulele de *glicogen* apar electronomicroscopic ca particule cu diametrul de aproximativ 20 nm. Cea mai frecventă localizare a lor este intermiofibrilară, la nivelul benzii I. Se apreciază că glicogenul, ca rezervă glucidică energetică, ar putea reprezenta 0,5—1% din

greutatea mușchiului. Granulele de *lipide* apar de obicei sferice, cu diametrul de 0,25 μm și localizate de-a lungul spațiilor intermiofibrilare fără o ordine precisă. La atleții antrenați granulele lipidice sînt mai numeroase.

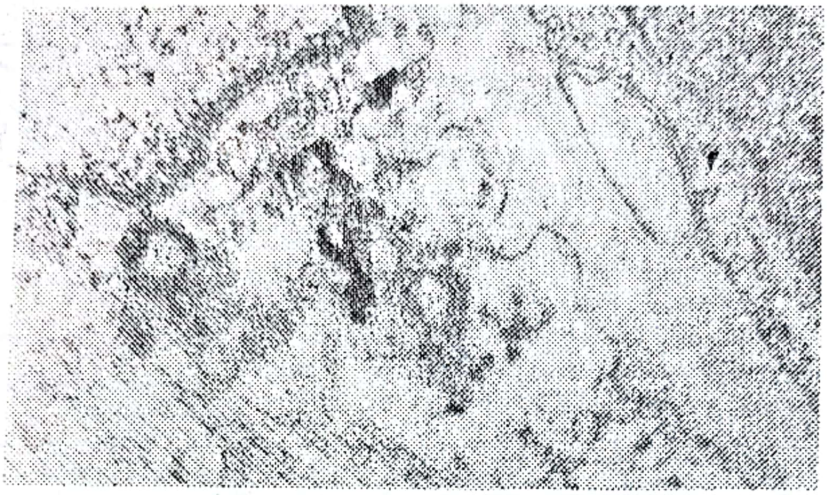


Fig. 8. 14. — Evidențierea complexului Golgi, cu localizare juxtanucleară, folosind ca *marker* ultracitochimic reacția pentru tiaminpirofosfatază. Imagine electronomicroscopică a unui fragment dintr-o fibră musculară din diafragmul de șobolan (din colecția prof. I. Diculescu).

8.2.1.2.4. Organite specifice

8.2.1.2.4.1. *Miofibrila striată și mecanismul contracției*

Substratul contractil în fibra musculară scheletică este reprezentat de miofibrilele striate (fig. 8.15), descrise și denumite astfel încă de Kölliker, în 1888. Fibra musculară scheletică este striată pentru că miofibrilele sale sînt striate. Deoarece miofibrilele *izolate* se contractă în prezența ATP-ului, este evident că ele sînt elementele contractile ale fibrei musculare scheletice.

Miofibrilele sînt organite speciale contractile, care ocupă cea mai mare parte din volumul fibrei — aproximativ 80% (vezi tabelul 8.IV). O fibră musculară scheletică poate conține de la cîteva sute pînă la cîteva mii de miofibrile. Ele au o grosime de 0,2—2 μm, se extind pe întreaga lungime a fibrei și sînt ordonate în pachete cu orientare longitudinală, cunoscute în histologia clasică drept *colonete Leydig*. Pe secțiuni transversale la microscopul optic, miofibrilele apar sub forma unor puncte fine, dispuse în grupuri delimitate prin fisuri sarcoplasmice. Aceste grupări „punctate" sînt descrise în histologia clasică sub numele de *cîmpuri Cohnheim* (fig. 8.2 b) și sînt corespondentul, pe secțiuni transversale, colonetelor Leydig din secțiunile longitudinale.

Striația (bandarea) miofibrilelor. Microscopia optică, cu contrast de fază sau în lumină polarizată, ca și microscopia electronică, au stabilit că miofibrilele sînt alcătuite dintr-o succesiune alternantă de benzi (discuri sau strii) cu proprietăți diferite (fig. 8.15—8.18). Principalele două benzi sînt:

— *banda A*, anizotropă în lumină polarizată, întunecată în contrast de fază, mai intens colorabilă cu eozină; dimensiuni aproximative — 1,5 μm;

— *banda I*, izotropă în lumină polarizată, clară în contrast de fază, mai slab colorabilă cu eozină; dimensiuni aproximative — 0,8 μm.

Scanned with OKEN Scanner

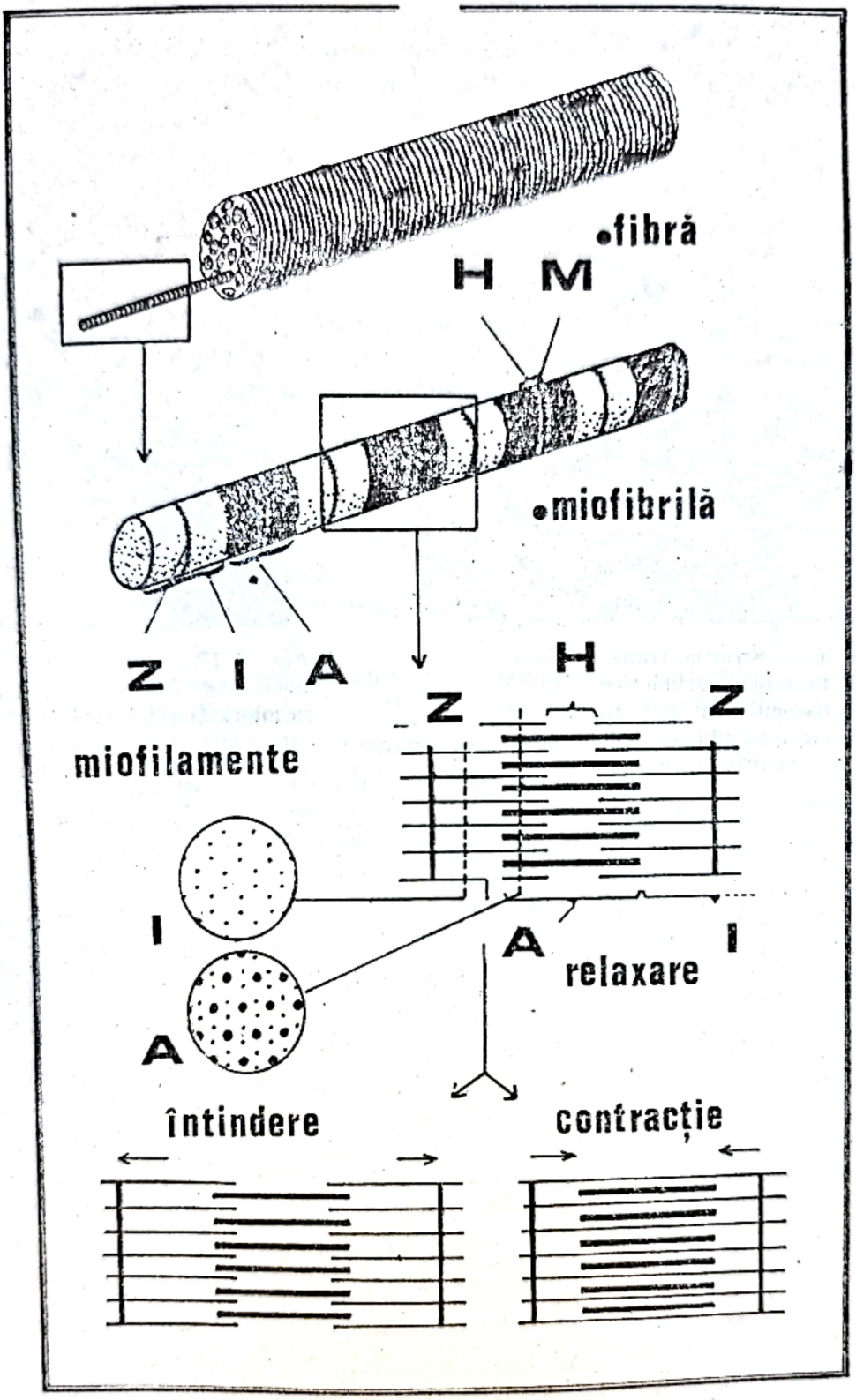


Fig. 8. 15. — Schema organizării substratului contractil din fibra musculară scheletică: miofibrilele (vizibile la microscopul optic) și miofilamentele (vizibile numai la microscopul electronic).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 8. 16. — Striația transversală a fibrelor musculare scheletice vizibilă la microscopul cu polarizație: se remarcă alternanța de benzi clare și întunecate.

Fig. 8. 17. — Striația transversală a unei fibre musculare, nefixată și necolorată, observată la microscopul cu contrast de fază. Se remarcă benzile clare (I) și întunecate (A).

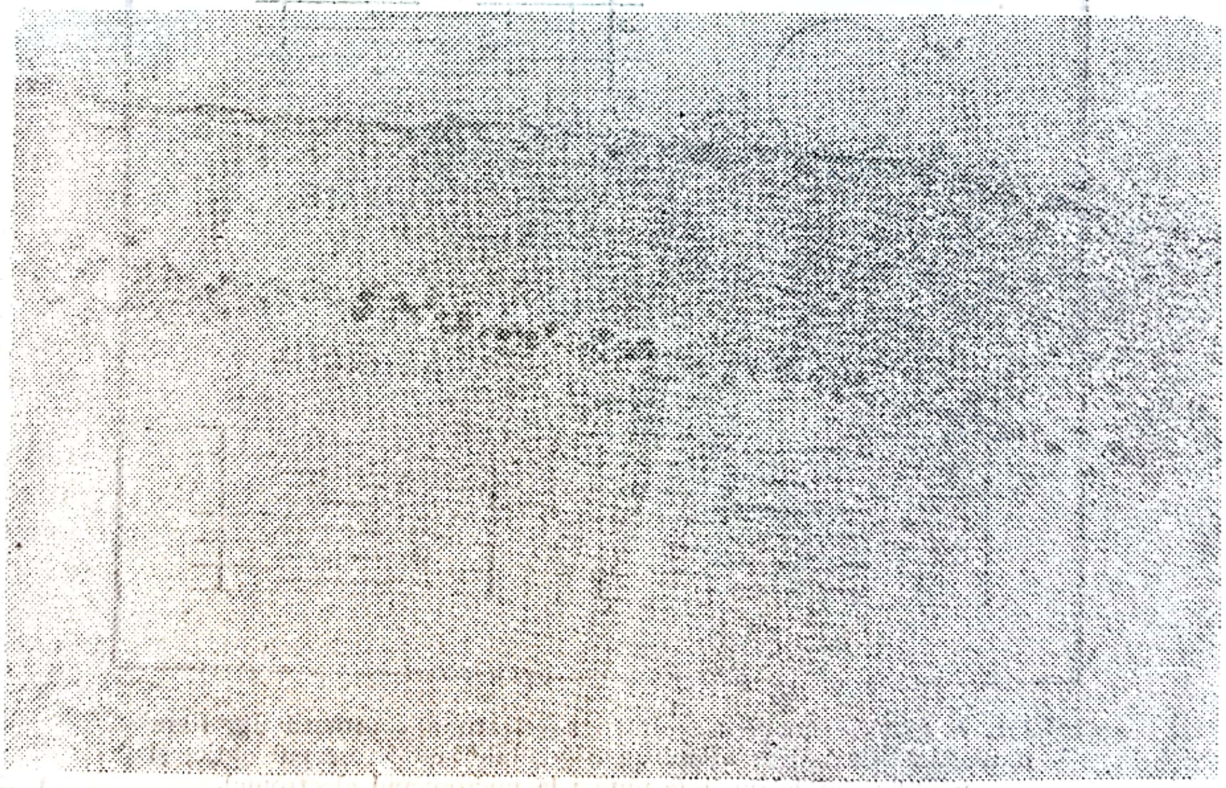


Fig. 8. 18. — Imagine electronomicroscopică a unui fragment dintr-o fibră musculară striată (sartorius de broască). Se observă sarcomerele și benzile Z, I, A, H și M. Poziția filamentelor subțiri și groase în sarcomer este marcată cu linii subțiri și, respectiv, groase.

La rîndul ei, banda A este bisectată de o bandă clară, *banda H* (după numele lui Hensen, care a descris-o primul), care este și ea bisectată de o bandă întunecată, *banda M* (de la *Mittellinie*, în germ.: linie de mijloc). Banda clară I este bisectată de o bandă întunecată numită banda Z (din germ.: *zwischen* = între). Banda Z este uneori denumită și linia Z. A fost de asemenea descrisă și o *bandă N*, poziționată în banda I între banda Z și joncțiunea I-A, în apropierea benzii Z.

Se consideră că unitatea fundamentală de structură și funcție a miofibrilei este *sarcomerul*. Un sarcomer se întinde de-a lungul miofibrilei pe distanța de cca 2,5 μm, fiind delimitat între două benzi Z. Deci un sarcomer cuprinde în mijlocul său o bandă A în întregime și, de o parte și de alta a ei, cîte o jumătate din benzile I adiacente. O miofibrilă striată este în ultimă instanță așezarea cap la cap a cîtorva zeci de mii de sarcomere.

Ultrastructură. Cercetările de microscopie electronică din perioada 1953—1960 au demonstrat că miofibrilele sînt alcătuite, la rîndul lor, din subunități ordonate paralel cu axa longitudinală, numite *miofilamente*. Au fost puse în evidență cu certitudine două tipuri de miofilamente care diferă atît ca poziție în sarcomer cît și ca lungime, diametru și compoziție. Deosebirea cea mai ușor de surprins pe imaginile electronomicroscopice fiind cea de diametru, cele două tipuri de miofilamente sînt consacrate sub denumirea de: *filamente subțiri* (dimensiuni 5—6 nm/2 μm) și *filamente groase* (dimensiuni 10—11 nm/1,5 μm).

Dispoziția caracteristică a celor două tipuri de filamente în sens longitudinal de-a lungul miofibrilei stă la baza aspectului striat la microscopul optic, în contrast de fază sau în lumină polarizată. Astfel, filamentele groase sînt dispuse în mijlocul sarcomerului corespunzînd zonei ocupate de banda A, iar la nivelul benzii I se găsesc numai filamente subțiri, care pornesc de o parte și de alta a benzii Z și pătrund în discul A pînă la limitele zonei H; cu excepția benzii M, unde se găsesc numai filamente groase, restul benzii A este constituită dintr-o interdigitare a filamentelor groase și subțiri (vezi fig. 8.15).

Pe secțiunile transversale ale miofibrilelor s-a putut observa că dispoziția tridimensională a miofilamentelor are un înalt grad de ordonare. Filamentele groase sînt despărțite prin spații de 30—45 nm, alcătuind un model hexagonal, iar filamentele subțiri sînt și ele dispuse după un model hexagonal, astfel încît la nivelul benzii A, unde miofilamentele se interdigitează, fiecare filament gros are în jurul său 6 filamente subțiri și fiecare filament subțire este înconjurat, la rîndul său, de 3 filamente groase, distanța care separă un filament subțire de unul gros fiind de cca 13 nm (vezi fig. 8.15).

De un interes particular pentru înțelegerea mecanismului contracției musculare este prezența pe suprafața filamentelor groase a așa-numitelor *punți transversale*. Ele apar pe imaginile electronomicroscopice ca proiecții laterale, perpendiculare pe axa filamentelor groase, avînd lățimea de 4 — 5 nm și lungimea de 6—13 nm (considerată din axul filamentului) și se extind către filamentele subțiri pe care par să le atingă (fig. 8.19).

Numărătoarea punților transversale pe imaginile electronomicroscopice a dus la cifre de 200—220 de punți transversale pentru un filament gros (H. E. Huxley, 1963). Dispoziția punților transversale pe filamentele

Scanned with OKEN Scanner

groase a fost stabilită cu un înalt grad de exactitate prin difracție cu raze X (Huxley și Brown, 1967) (vezi fig. 8.19). În mușchiul în stare de repaus proiecțiile laterale ale filamentelor groase sînt distribuite regulat, aranjamentul lor de-a lungul filamentului urmînd un traiect spiralat. La același nivel există cîte două punți transversale dispuse simetric, iar perechile de punți sînt dispuse la intervale de 14,3 nm pe lungimea filamentului și decalate unele față

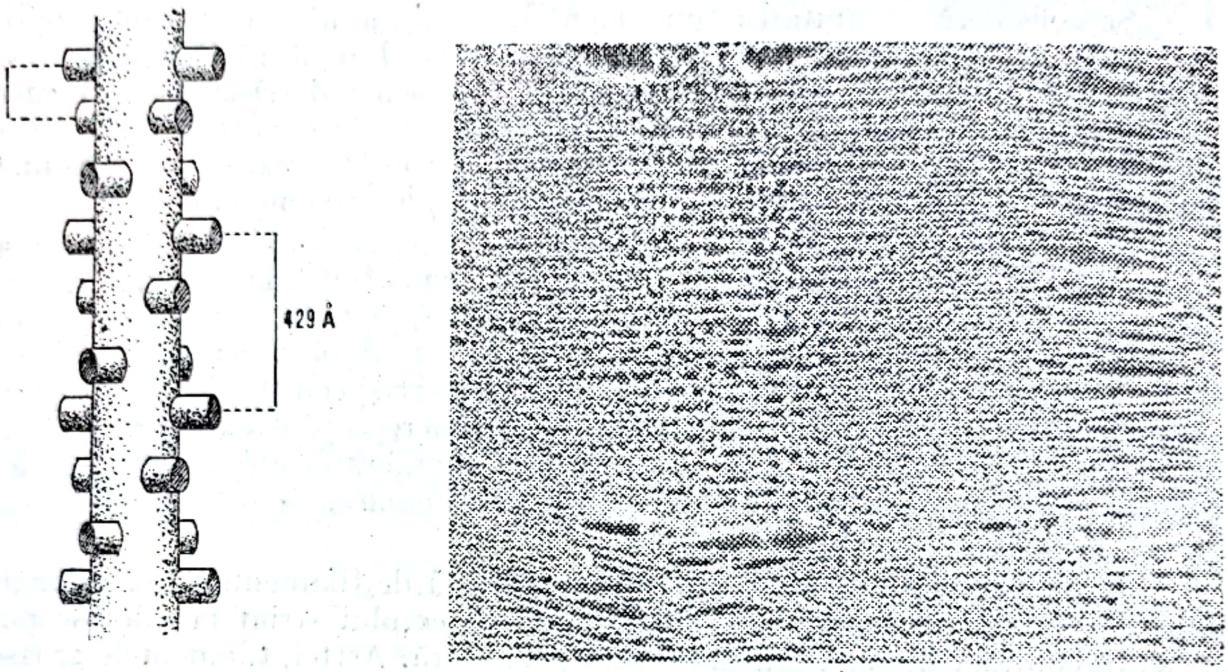


Fig. 8. 19. —
a — Reprezentare idealizată a aranjamentului punților transversale la nivelul filamentului gros de miozină; *b* — imagine electronomicroscopică *(freeze-etching)*: (prin amabilitatea dr. Clara Franzini-Armstrong).

de altele cu un unghi de 120°. Astfel, spre filamentul subțire, care se găsește în mijlocul a trei filamente groase, se întinde cîte o punte transversală de la aceste filamente groase, la fiecare 14,3 nm.

Componentele ultrastruturale ale sarcomerelor (miofilamentele și benzile M și Z) sînt în ultimă instanță alcătuite din agregate supramoleculare proteice (tabelul 8.VI) Este de remarcat că pînă în momentul de față au fost identificate cel puțin 20 de proteine miofibrilare, dar numai cîteva dintre ele sînt, cel puțin cantitativ, majore. Din punct de vedere al contracției aceste proteine miofibrilare (contractile) se clasifică în trei categorii: *a) proteine contractile fundamentale* — miozina și actina; *b) proteine contractile reglatoare* — tropomiozina și troponina, care reglează interacțiunea miozină-actină și *c) alte proteine miofibrilare* (contractile?). Categoria „alte proteine miofibrilare" conține numeroase tipuri de proteine, majoritatea numai parțial caracterizate, și al căror rol pare mai degrabă structural, în sensul organizării supramoleculare a sarcomerului.

Filamentele groase sînt filamente de miozină

Miozina reprezintă fracțiunea proteică cea mai importantă atît cantitativ cît și funcțional, în mușchi. Într-un centimetru cub de mușchi scheletic se găsesc circa 10^{17} molecule de miozină. Molecula de miozină este o mole-

Scanned with OKEN Scanner

Proteinele miofibrilare în mușchiul scheletic

Denumirea proteinei	Descoperită de	Cantitate (în procente)	Greutate moleculară (kD)	Localizare în sarcomer	Caracteristici și rol(uri)
1	2	3	4	5	6
Proteine contractile fundamentale					
Miozina	Kühne 1864	45	470	filamentele groase	— Subunități: H-meromiozină(HMM) L-meromiozină(LMM) — HMM formează punțile transversale — are activitate ATP-azică — interacționează cu actina
Actina	Straub, 1943	20	42	filamentele subțiri	— Există ca monomer G-actină și polimer F-actină — Stimulează activitatea ATP-azică a miozinei
Proteine contractile reglatoare					
Tropomiozina	Bailey, 1948	5	70	filamentele subțiri	— Molecula este un bastonaș lung de 40 nm; se leagă de actină — Împreună cu complexul troponinic, reglează interacțiunea miozină-actină
Troponina	Ebashi, 1964	5	76	filamentele subțiri	— 3 subunități: — troponina C, GM 18 kD leagă ionii de Ca^{2+} — troponina I, GM 21 kD inhibă activitatea actinei — troponina T, GM 37 kD se leagă de tropomiozină — activarea prin C^{2+} duce la sistarea inhibiției contracției de către complexul tropomiozină-troponine

Scanned with OKEN Scanner

1	2	3	4	5	6
		Alte proteine miofibrilare			
alfa-Actinina	Ebashi și Ebashi, 1965	2	190	banda Z (numai?)	— 2 subunități identice cu GM 95 kD; — molecula are formă de bastonaș cu diametrul 30/2 nm; — formează complexe cu F-actina, inhibate de tropomiozină; — ancorează filamentele subțiri în banda Z
beta-Actinina	Maruyama, 1965	< 1	71	capetele libere ale filamentelor subțiri	— dimer cu subunități de 37 și 34 kD — diametrul se leagă de F-actină și inhibă recombinarea fragmentelor de F-actină — reglează lungimea filamentelor
gamma-Actinina	Kuroda și Maruyama, 1976	< 1	35	filamentele subțiri (banda Z?)	— inhibă polimerizarea G-actinei — se leagă de F-actină
Eu-Actinina	Kuroda și colab., 1981	< 1	42	banda Z	— deși are GM identică ca actina a fost discriminată prin focalizare izoelectrică — rol necunoscut
Conectina*	Maruyama și colab., 1976	65	5 000	filamente Z—Z (rețeaua endosarcomer)	— 2 subunități; — alfa GM 2 800 kD — beta GM 2 100 kD; filament cu dimensiuni 300—400/ /3—4 nm
(Titina)	Wang și colab., 1979			leagă filamentele groase de benzile Z	— rol probabil în determinarea elasticității sarcomerului
Nebulina	Wang și Williamson, 1980	3	600	liniile N rețeaua endosarcomerică	— se leagă probabil de filamentele Z—Z — rol încă necunoscut
Filamina**	Wang și colab., 1975	< 1	480	banda Z	— dimer cu subunități de 240 kD — se leagă de F-actină — rol încă necunoscut
Proteina F	Starr și Offer, 1971	< 1	110	filamentele groase	— se leagă de miozină, legare inhibată de proteina C — rol încă necunoscut (fosfofructokinaza?)

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 8. VI continuare

1	2	3	4	5	6
Proteina C***	Offer și colab., 1973	1	140	filamentele groase	— rol încă necunoscut
Proteina I	Ohashi și colab., 1977	< 1	50	filamentele groase (cu excepția zonei lor din banda M)	— inhibă stimularea Mg^{2+}—dependentă a actomiozin ATP-azei (în absența Ca^{2+}, nu și în prezența Ca^{2+})
Proteina benzii Z	Ohashi și Maruyama, 1979	< 1	55	banda Z	— ?
Sinemina	Granger și Lazarides, 1980	< 1	230	banda Z	— ?
Vimentina	Granger și Lazarides, 1979	< 1	58	banda Z	— ?
Proteina M****	Masaki și Takaiti, 1974	2	165	banda M	— ?
Miomesina	Grobe și colab., 1984	< 1	185	banda M	— ?
Creatinkinaza	Wallimann și colab., 1978	< 1	84	banda M (substriațiile 4, 4')	— 2 subunități fiecare cîte 42 kD — catalizează reacția CP+ADP⇔ATP+C

* Denumirea *conectină* a fost recent dată unei proteine din suprafața celulară, care are proprietatea de a lega laminina și actina (Brown și colab., 1983). Această proteină este însă complet diferită de proteina conectină, prezentă în miofibrilă. Pe de altă parte, conectina miofibrilară este una și aceeași proteină cu proteina numită titina de Wang și colab. (1979).

** Filamina a fost inițial descoperită în fibrele musculare netede și s-a crezut cîțiva ani că nu ar fi prezentă în miofibrilele fibrelor musculare scheletice. Actualmente este demonstrat că filamina este un component al miofibrilelor atît în fibrele musculare scheletice cît și în cele cardiace.

*** Proteina C din miofibrile nu trebuie confundată cu proteina C din complexele de ribonucleoproteine heterogene (hnRNP), existente în nucleul celulelor eucariote ca forme „nefinisate" de transcripte. Componenta structurală majoră a acestor complexe sînt proteinele 408, clasificate în trei dublete: A, B, C, în care proteinele C sînt divizate în C_1 și C_2. Proteina C nucleară și proteina C miofibrilară sînt numai coincidențe terminologice.

**** Pînă de curînd ambele denumiri — proteina M și miomesina — erau atribuite aceleiași proteine de 165 kD. Actualmente, după identificarea unei alte proteine cu GM 185 kD, proteina de 165 kD este denumită proteina M și cea de 185 kD, miomesină.

culă „asimetrică" (fig. 8.20), ceea ce explică anizotropia (birefringența) benzilor A. Molecula de miozină are aspectul unui bastonaș lung și subțire, cu o regiune globuloasă (capul moleculei) la una din extremități. Dimensiunile moleculei sînt: 160 nm lungime și 2 nm grosime, regiunea globulară avînd 4—5 nm/15—20 nm. Capul moleculei de miozină este bipartit (moleculă bicefală), fiind alcătuit din 2 subunități sau 2 lobi.

Detalii asupra alcătuirii moleculei de miozină au fost obținute prin studii de proteoliză limitată, care au arătat că molecula de miozină este alcătuită din subunități neechivalente. Sub acțiunea controlată a tripsinei, din molecula de miozină se formează două fragmente numite *meromiozine:* o

Scanned with OKEN Scanner

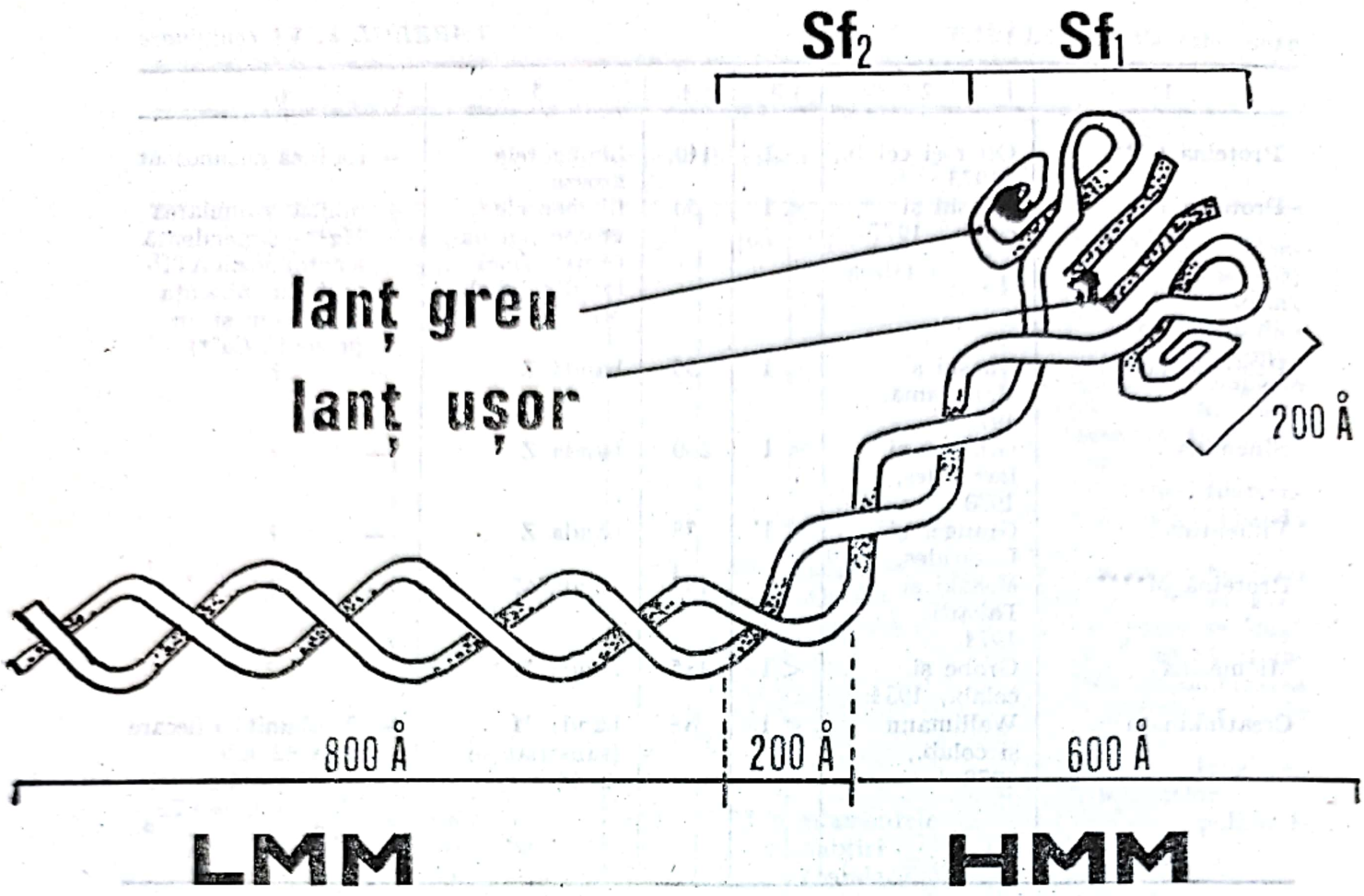


Fig. 8. 20. — Conformația moleculei de miozină:
LMM — L-meromiozina; *HMM* — H-meromiozina; *Sf1* — subfragmentul 1, corespunzînd punții transversale, unde este localizată activitatea ATP-azică și prezent situsul de interacțiune cu actina; *Sf2* — subfragmentul 2.

meromiozină ușoară, *L-meromiozina* (engl.: *light* = ușor) și alta grea, *H-meromiozina* (engl.: *heavy* = greu). L-meromiozina apare ca un bastonaș cu lungimea de 80 nm și grosimea de 2 nm iar H-meromiozina are o porțiune liniară de 60 nm, care se termină cu o porțiune globulară de 20/5 nm. L-meromiozina nu are activitate ATP-azică și nu se combină cu actina. H-meromiozina poate fi scindată, la rîndul ei, sub acțiunea papainei, în două subfragmente: *subfragmentul 1* (S-1) și *subfragmentul 2* (S-2). S-1 are o greutate moleculară de 120 kD și corespunde porțiunii globulare a H-meromiozinei. El reține cele două proprietăți fundamentale ale miozinei native: activitatea ATP-azică și capacitatea de a interacționa cu actina. S-2 are o greutate moleculară de 60 kD și îi lipsesc aceste caracteristici. Deci, porțiunea liniară a moleculei de miozină este formată din L-meromiozină + S-2 al H-meromiozinei, iar capul moleculei de miozină este reprezentat de S-1 al H-meromiozinei.

Din punct de vedere al alcătuirii polipeptidice, molecula de miozină este formată din: *două lanțuri grele* (fiecare cu o greutate moleculară de cca 200 kD) și 2—4 *lanțuri ușoare*, cu greutăți moleculare de 15—20 kD; numărul de lanțuri ușoare variază în funcție de tipul fibrei musculare. Cele două lanțuri grele se întind pe toată lungimea moleculei, iar lanțurile ușoare sînt localizate în capul moleculei de miozină, la nivelul S-1 al H-meromiozinei.

Scanned with OKEN Scanner

Miozina în celulele nemusculare. În ultimii ani, proteine cu caracteristici fizico-chimice asemănătoare miozinei au fost identificate și caracterizate într-o largă varietate de celule nemusculare (exemplu: plachetele sanguine umane și chiar eritrocitele, fibroblastele, unde reprezintă 2,5% din proteinele totale, celulele nervoase din creier, unde reprezintă 0,5% din proteinele

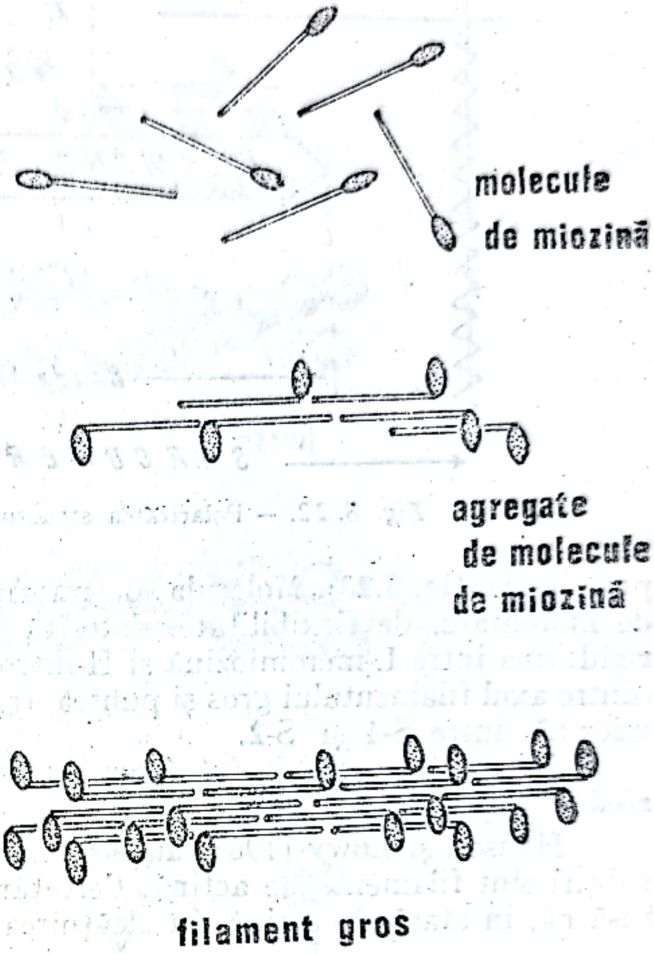


Fig. 8. 21. — Reprezentare simplificată a agregării moleculelor de miozină pentru a forma un filament gros. Se observă cum proemină capetele moleculelor de miozină pe suprafața filamentului gros, formînd punțile transversale pe filamentul gros.

totale ș.a.m.d.). Miozinele nemusculare sînt de asemenea alcătuite din două lanțuri grele, dar există o mare variabilitate în privința lanțurilor ușoare. De aceea, se consideră că principala deosebire dintre miozina musculară și miozinele nemusculare se datorește numărului și tipului de lanțuri ușoare.

Agregarea moleculelor de miozină (cîteva sute) pentru a forma un filament gros, se face după tipul „margine-la-margine". Așezarea moleculelor de miozină în filamente groase se realizează în așa fel (fig. 8.21), încît porțiunile liniare ale moleculelor de miozină, respectiv L-meromiozinele, formează axul filamentului gros, iar porțiunile globulare, respectiv H-meromiozinele, se proiectează în afara filamentului gros formînd punțile transversale. Trebuie menționat că filamentul gros de miozină are o *polaritate structurală*. Moleculele de miozină din cele două jumătăți ale filamentului gros sînt dispuse în două seturi antiparalele (vezi fig. 8.21), cu o reversie a polarității structurale (direcția așezării moleculelor asimetrice de miozină) la mijlocul filamentului. De aceea, porțiunea mijlocie a filamentului gros, care corespunde ca așezare în sarcomer benzii M, nu prezintă punți transversale (fig. 8.22).

Scanned with OKEN Scanner

Un aspect important al arhitecturii moleculare a filamentului gros, aspect considerat cheie în mecanismul contracției (H. E. Huxley, 1969), este posibilitatea punților transversale de a se deplasa în raport cu filamentul

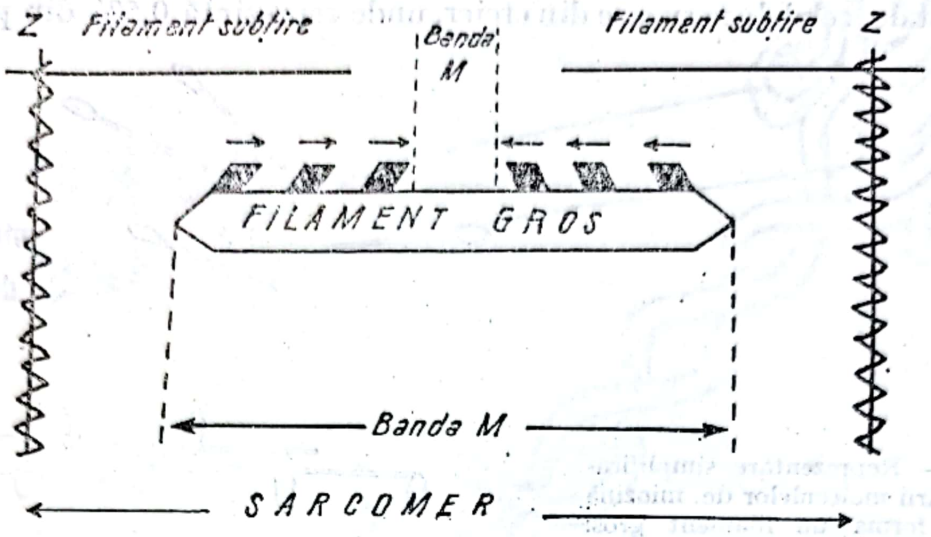


Fig. 8.22. — Polaritatea structurală a filamentului gros.

propriu-zis (fig. 8.23). Molecula de miozină are în structura sa două regiuni de mobilitate, de flexibilitate, datorită lipsei în acele zone a alfa-helixului rigid: una între L-meromiozină și H-meromiozină, care corespunde joncțiunii dintre axul filamentului gros și puntea transversală, și alta în însăși H-meromiozină, între S-1 și S-2.

Filamentele subțiri sînt filamente de actină, dar conțin și tropomiozină și troponină.

Hanson și Lowy (1963) au demonstrat neechivoc faptul că filamentele subțiri sînt filamente de actină. Cercetări ulterioare (1964, 1968) au arătat însă că, în afară de actină, în alcătuirea filamentelor subțiri mai intră tropomiozina și troponina. Actualmente este unanim acceptat următorul model de organizare supramoleculară a filamentului subțire (fig. 8.24):

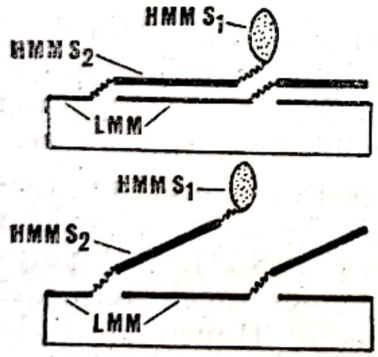


Fig. 8.23. — Mobilitatea punților transversale *(HMM-Sl)* față de filamentul gros propriu-zis, alcătuit din porțiunile lineare ale moleculelor de miozină *(LMM)*.

— actina fibrilară (F-actina) formează porțiunea axială, filamentul subțire propiu-zis;

— tropomiozina este așezată sub formă de bastonașe, de 40 nm lungime, de-a lungul axului de F-actină;

— troponina formează unități proteice globulare, dispuse la intervale de 40 nm de-a lungul filamentului.

Actina există sub două forme: actină *globulară* (G-actina), care este monomerul, și actină *fibrilară* (F-actina), care este forma polimerizată (vezi

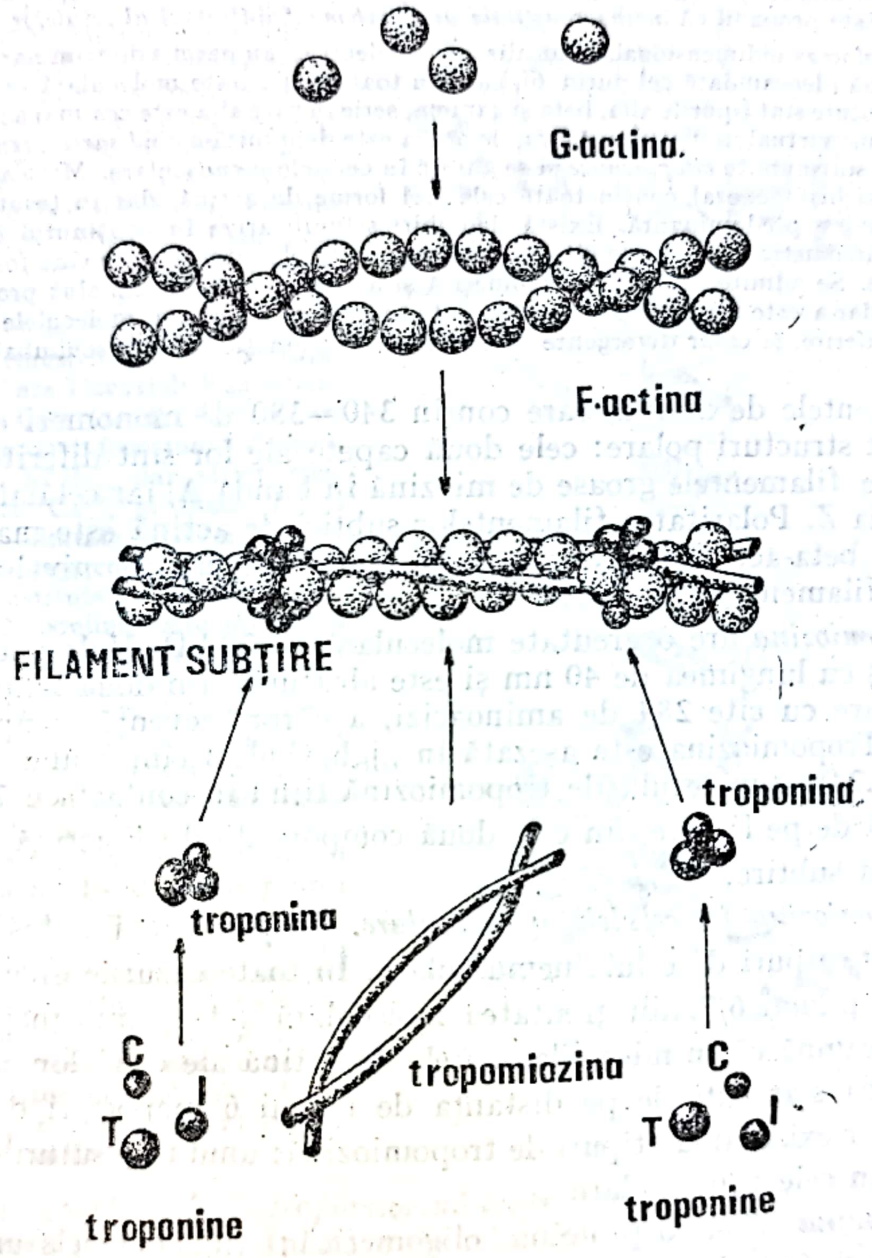


Fig. 8. 24. — Reprezentare schematică a organizării moleculare a filamentului subțire, alcătuit din *F-actină* (actină fibrilară formată prin polimerizarea actinei globulare, G-actina), *tropomiozină* și *complex troponinic* (troponinele T, C și I).

fig. 8.24). Cele două forme sînt interconvertibile. G-actina este o moleculă aproximativ sferică, cu diametrul de cca 5,5 nm, fiind alcătuită prin înfășurarea pe sine a unui singur lanț polipeptidic cu 374 de aminoacizi. F-actina se prezintă sub formă de filamente neramificate, cu grosimea de 7—8 nm. Filamentul este alcătuit din două lanțuri, împletite unul în jurul celuilalt

într-un superhelix neintegral, cu o perioadă repetitivă de cca 35 nm. Fiecare lanț este alcătuit dintr-o singură serie de subunități de G-actină, pentru fiecare tur de superhelix existînd 13,5 unități de G-actină.

Actina în celulele nemusculare. Proteine de tipul actinei au fost identificate și izolate dintr-o varietate largă de celule (exemplu: celule nervoase, plachete sanguine, eritrocite, fibroblaste, celule renale etc.). În general, în celulele nemusculare actina reprezintă 2—8% din totalul proteinelor. Este probabil că *actina constituie un component universal al celulelor eucariote.*

Electroforeza bidimensională și focalizarea izoelectrică au permis discriminarea mai multor tipuri de actină (deocamdată cel puțin 6), care au toate o greutate moleculară în jur de 43 kD. Mai bine cunoscute sînt tipurile alfa, beta și gamma, serie în care alfa este cea mai acidă. Mușchiul scheletic conține virtual numai *actină alfa*, de aceea este denumită *actină sarcomerică*, iar *actinele beta și gamma* sînt numite *citoplasmice* și se găsesc în celulele nemusculare. Mioblaștii înainte de a fuziona (vezi histogeneza) conțin toate cele trei forme de actină, dar în țesutul diferențiat forma alfa devine predominantă. Există deosebiri semnificative în conținutul de aminoacizi între actina sarcomerică și actinele citoplasmice, dar actinele citoplasmice sînt foarte asemănătoare între ele. Se admite că actina sarcomerică și actinele citoplasmice sînt produși ai unor gene diferite, dar aceste gene sînt înalt conservate în evoluție. Oricum, moleculele de actină din surse foarte diferite, și chiar divergente în evoluție, sînt funcțional interschimbabile.

Filamentele de actină, care conțin 340—380 de monomeri de G-actină fiecare, sînt structuri polare: cele două capete ale lor sînt diferite, unul este liber printre filamentele groase de miozină în banda A, iar celălalt este ancorat în banda Z. Polaritatea filamentelor subțiri de actină este marcată și de localizarea beta-actininei (vezi tabelul 8.VI) numai la nivelul capetelor libere ale filamentelor subțiri.

Tropomiozina are o greutate moleculară de 70 kD. Molecula are formă de bastonaș cu lungimea de 40 nm și este alcătuită din două lanțuri polipeptidice, fiecare cu cîte 284 de aminoacizi, a căror secvență completă a fost elucidată. Tropomiozina este așezată în „jgheabul" filamentului de F-actină (vezi fig. 8.24), o moleculă de tropomiozină fiind în contact cu 7 monomeri de G-actină de pe fiecare din cele două componente de F-actină de-a lungul filamentului subțire.

Tropomiozina în celulele nemusculare. Tropomiozina a fost detectată în mai multe tipuri de celule nemusculare. În toate cazurile greutatea moleculară este numai 6/7 din greutatea moleculară a tropomiozinei musculare, ceea ce înseamnă că în microfilamentele de actină ale celulelor nemusculare, tropomiozina s-ar extinde pe distanța de numai 6 monomeri de G-actină. Se pare că ar exista două tipuri de tropomiozină: unul în țesuturile musculare și celălalt în cele nemusculare.

Troponina este o proteină oligomerică; în nomenclatura propusă de Graeser și Gergely și unanim acceptată, este compusă din următoarele trei componente:

— *troponina C*, care leagă specific ionii de calciu, legarea ionilor de calciu de troponina C fiind semnalul declanșator al contracției fibrei musculare striate; foarte recent structura moleculei de troponină C a fost elucidată (fig. 8.25);

— *troponina T*, care are o mare afinitate pentru, și se leagă de, tropomiozină;

Scanned with OKEN Scanner

— *troponina I*, care cooperează cu celelalte două troponine pentru a menține tropomiozina în poziția de blocare a interacțiunii miozină-actină *(vide infra)*.

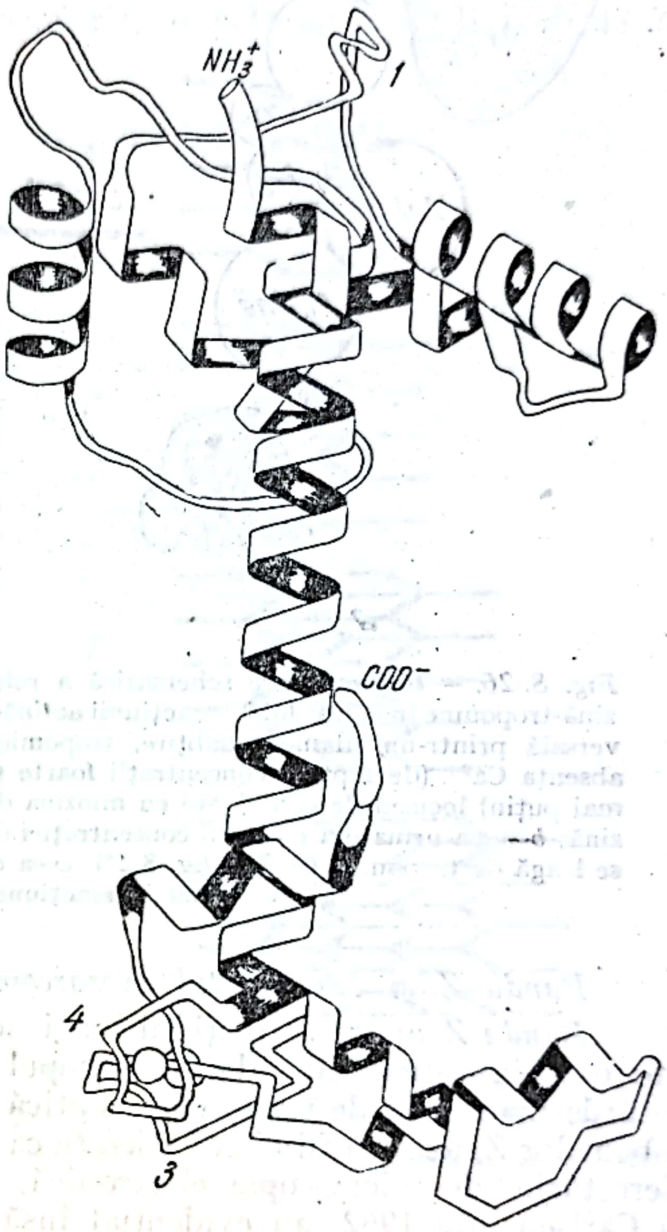


Fig. 8. 25. — Conformația tridimensională a moleculei de troponină C din mușchiul scheletic, stabilită cu o rezoluție structurală sub 3 Å (Herzberg și James, 1985; Sundaralingam și colab., 1985). Molecula are o lungime de cca 70 Å și aspectul general de „halteră". Se disting două domenii: unul N-terminal (în partea superioară), cuprinzînd primii 85 de aminoacizi ai moleculei, și unul C-terminal (în partea inferioară, cuprinzînd aminoacizii 97—162). Cele două domenii în care se află locurile de legare a Ca^{2+} sînt separate printr-o porțiune lineară, cu structură alfa-helix, corespunzînd la 9 ture. Troponina C are 4 locuri de legare pentru ionii de Ca^{2+} (1—4): două locuri cu joasă afinitate (constanta de asociere $K \simeq 10^{-5}M$), dar strict specifice pentru Ca^{2+}, și două locuri de mare afinitate ($K \simeq 10^{-7}M$), care pot însă lega competitiv și Mg^{2+}. Aceasta constituie un contrast evident cu calmodulina, care are și ea 4 locuri de legare pentru Ca^{2+}, dar cu afinitate echivalentă între ele. Cele două locuri de legare pentru Ca^{2+}, care au mare afinitate, sînt situate în domeniul C-terminal (3 și 4), iar cele două locuri de legare pentru Ca^{2+}, care au joasă afinitate sînt situate în domeniul N-terminal (1 și 2). Fiecare loc de legare pentru Ca^{2+} corespunde unei secvențe de 12 aminoacizi. În condiții de repaus domeniul C-terminal este saturat cu Ca^{2+} și/sau Mg^{2+}. La creșterea concentrației intracelulare a Ca^{2+}, domeniul N-terminal, care este domeniul reglator al moleculei, leagă și el Ca^{2+}, modificînd conformația moleculei.

Rolul complexului tropomiozină-troponine în controlul interacțiunii miozină-actină (fig. 8.26). În stare de relaxare, la o concentrație foarte scăzută a calciului liber intracelular (aproximativ 10^{-7} M), în condițiile în care troponina C nu leagă ionii de calciu, tropomiozina ocupă o poziție de blocare, care împiedică steric interacțiunea dintre miozină și actină, adică interacțiunea dintre puntea transversală (S-1 al H-meromiozinei) și monomerii de G-actină din filamentul subțire de F-actină. Prin legarea ionilor de calciu de troponina C, se produce o modificare de conformație, care se transmite *via* complexul troponinic la tropomiozină și determină o deplasare de poziție a tropomiozinei cu cca 1 nm, într-o poziție care face posibilă interacțiunea miozină-actină, prin expunerea locului de interacțiune cu miozina de pe

Scanned with OKEN Scanner

G-actină. Deci, tropomiozina acționează ca un sistem de amplificare a semnalului recepționat de troponina C prin legarea ionilor de calciu și transmiși prin tropomiozină celor 7 (sau 14) G-actine cu care vine în contact.

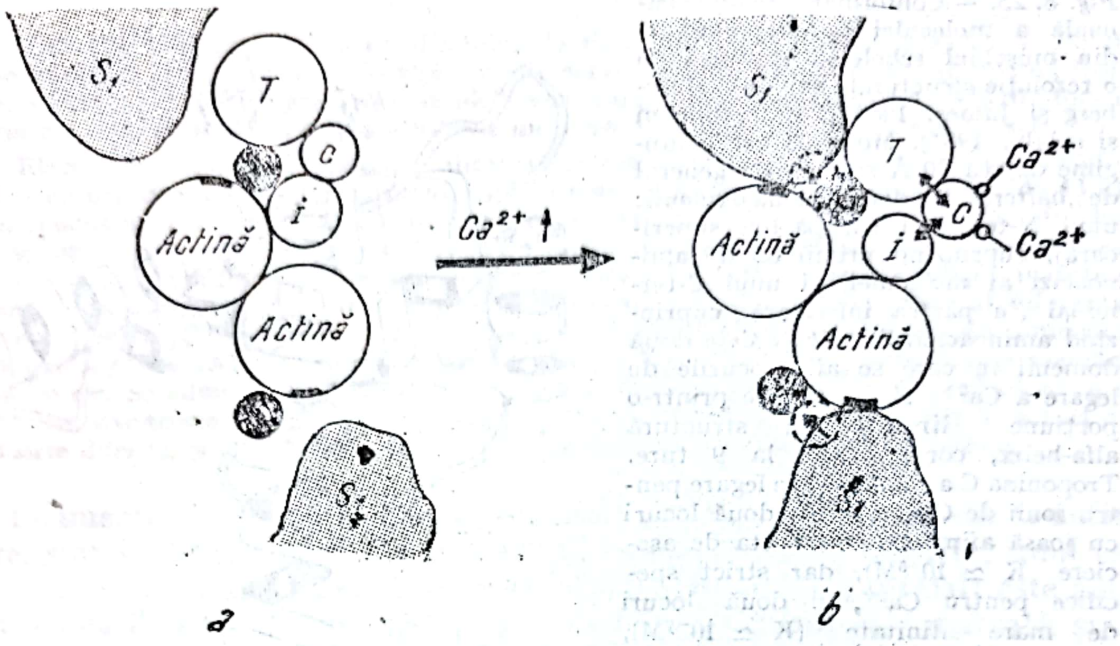


Fig. 8. 26. — Reprezentare schematică a rolului reglator al complexului tropomiozină-troponine în controlul interacțiunii actină-miozină (desenul arată o secțiune transversală printr-un filament subțire, tropomiozina fiind figurată în negru): *a* — în absența Ca^{2+} (de fapt la concentrații foarte scăzute de Ca^{2+}, de ordinul 10^{-7}M sau mai puțin) locusul de combinare cu miozina de pe actină este mascat de tropomiozină; *b* — ca urmare a creșterii concentrației de Ca^{2+} (în jur de 10^{-6}M), ionii de Ca^{2+} se leagă de troponina C (vezi fig. 8.25), ceea ce face ca tropomiozina să se deplaseze permițînd interacțiunea actină-miozină.

Banda Z și citoscheletul exosarcomeric și endosarcomeric

Banda Z apare în secțiuni longitudinale ca o linie întunecată, atît în microscopia optică cît și la microscopul electronic, în mijlocul benzii I. Cercetările mai vechi de microscopie optică nu au putut clarifica structura fină a benzilor Z, acestea fiind considerate ca simple „tendoane" ale sarcomerelor. Cercetările de microscopie electronică, începînd cu cele ale lui Knappeis și Carlsen, din 1962, au evidențiat însă o structură cu o organizare foarte complicată (fig. 8.27 și 8.28). Banda Z este în esență alcătuită dintr-o rețea tridimensională de *filamente de legătură*, care solidarizează filamentele subțiri de actină din două sarcomere adiacente. Deci filamentele subțiri *nu* străbat banda Z trecînd dintr-un sarcomer în altul, ci se termină în banda Z, unde se ancorează; deci filamentele subțiri sînt și ele monosarcomerice ca și filamentele groase.

Din punct de vedere al compoziției chimice, principalul component este *alfa-actinina* (vezi tabelul 8.VI). S-au mai descris și alte componente proteice în banda Z, cum ar fi: eu-actinina, proteina Z, filamina, amorfina și zenina (vezi tabelul 8.VI), dar acestea nu sînt încă suficient caracterizate.

Rolul benzii Z pare să fie în primul rînd structural, de a menține filamentele în poziția lor corectă pentru a asigura o alunecare eficientă a fila-

Scanned with OKEN Scanner

mentelor subțiri printre cele groase în timpul contracției. Banda Z nu participă propiu-zis în contracție căci fibre musculare din care s-au extras selectiv benzile Z se pot contracta (L. M. Popescu, observații nepublicate).

În legătura cu banda Z trebuie menționate două achiziții importante din ultimii cîțiva ani: demonstrarea existenței unui citoschelet exosarcomeric și a unui citoschelet endosarcomeric, ambele ancorate în benzile Z.

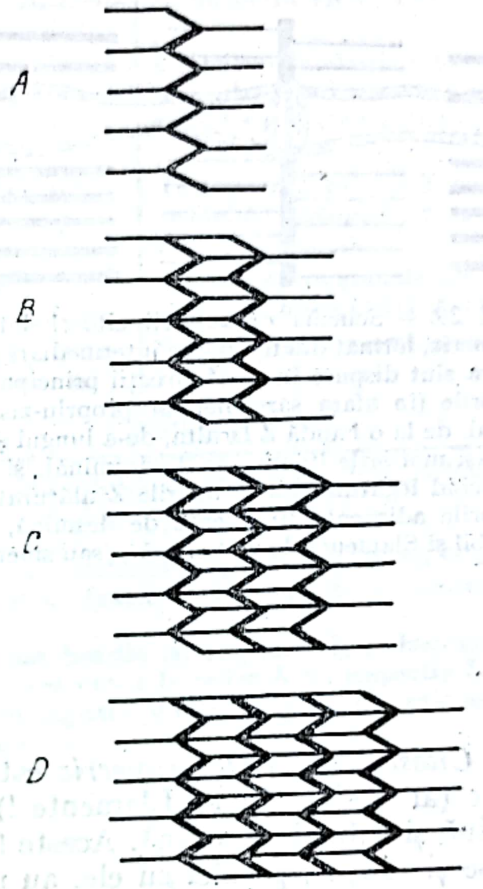


Fig. 8.27. — Reprezentare schematică a ultrastructurii benzilor Z, așa cum reiese din secțiuni longitudinale (după Goldstein și colab., 1979, modificat): *A* — în forma cea mai simplă de organizare banda Z constă dintr-un singur set de filamente de legătură (linii groase) între filamentele de actină (linii subțiri) a două sarcomere adiacente; rezultatul este o structură în zig-zag; *B* — ultrastructura tipică a benzii Z pentru fibrele scheletice cu contracție rapidă (fibre albe) un al doilea set de filamente de legătură este adăugat; *C* — ultrastructura tipică a benzii Z pentru fibrele musculare scheletice cu contracție lentă *(fibre roșii)*: un al treilea set de filamente de legătură este adăugat; *D* — ultrastructura benzii Z în mușchiul cardiac.

Citoscheletul exosarcomeric este reprezentat de o rețea de filamente intermediare (10 nm) care se găsesc *printre* miofibrile. Aceste filamente sînt orientate în două direcții principale: *a)* longitudinal, de-a lungul și în jurul

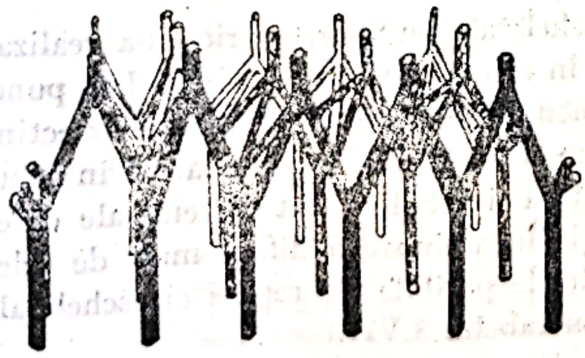


Fig. 8.28. — Reprezentare tridimensională a ultrastructurii benzii Z corespunzînd reprezentării plane din fig. 8.27.

miofibrilelor, făcînd legătura perisarcomeric între două benzi Z succesive; aceste filamente sînt alcătuite din desmină; *b)* transversal, între miofibrile, făcînd legătura între benzile Z dintre două miofibrile adiacente; aceste fila-

Scanned with OKEN Scanner

mente sînt alcătuite din desmină, vimentină și/sau sinemină (fig. 8.29). Filamentele exosarcomerice cu orientare transversală sfîrșesc în periferia fibrei, unde se atașează de zone speciale de ancorare, prezente pe versantul intern al sarcolemei, numite *costamere*, în alcătuirea cărora intră probabil vinculina (fig. 8.30). Rolurile posibile ale rețelei citoscheletale exosarcomerice sînt redate pe scurt în tabelul 8.VII.

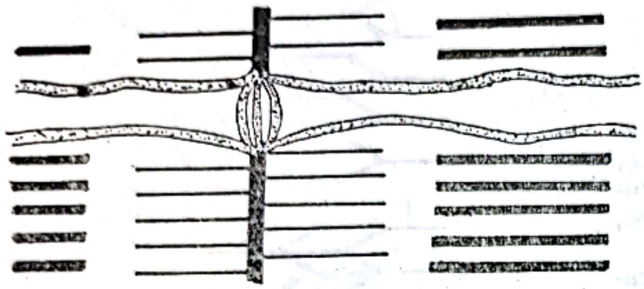


Fig. 8. 29. — Schema organizării citoscheletului exosarcomeric, format din filamente intermediare de 10 nm. Acestea sînt dispuse în două direcții principale printre miofibrile (în afara sarcomerelor propriu-zise): longitudinal, de la o bandă Z la alta, de-a lungul și în afara aceleiași mofibrile (filamente de desmină), și transversal, făcînd legătura dintre benzile Z alăturate a două miofibrile adiacente (filamente de desmină, dar probabil și filamente de vimentină și/sau sinemină).

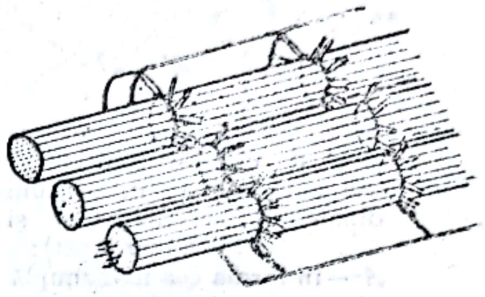


Fig. 8. 30. — Reprezentare tridimensională a citoscheletului exosarcomeric format din filamente intermediare. Se remarcă două feluri de filamente: longitudinale, perisarcomerice (de la o bandă Z la alta de-a lungul aceleiași miofibrile) și transversale, de la o miofibrilă la alta (în dreptul benzilor Z). Rețeaua citoscheletală transversală se atașează de sarcolemă la nivelul căreia, pe versantul ei intracelular, există benzi dense de ancorare (costamere), corespunzînd localizării benzilor Z.

Citoscheletul endosarcomeric este reprezentat de un tip special de filamente (al treilea tip de filamente !) clar distincte de filamentele groase de miozină și subțiri de actină. Aceste filamente sînt dispuse printre filamentele groase și subțiri, paralel cu ele, au grosimea de 2—6 nm (se deosebesc și de rețeaua exosarcomerică) și se întind în interiorul sarcomerului de la o bandă Z la alta *(filamente Z-Z)* (fig. 8.31). Trecînd prin banda M, filamentele Z-Z formează probabil așa-numitele filamente M (vezi banda M). Filamentele Z-Z sînt legate între ele în sens transversal, în anumite puncte specifice, corespunzînd liniilor N_1 și N_2, ca și joncțiunii I-A.

Evidențierea acestei rețele citoscheletale endosarcomerice s-a realizat grație mai ales cercetărilor întreprinse în ultimii ani de K. Wang. Din punct de vedere al compoziției chimice, filamentele Z-Z sînt alcătuite din conectină (titină), iar legăturile transversale dintre ele sînt probabil realizate prin nebulină (vezi tabelul 8.VI). De altfel conectina și nebulina sînt proteine ale căror proprietăți de solubilitate și compoziție în aminoacizi diferă mult de celelalte proteine miofibrilare majore. Rolurile posibile ale rețelei citoscheletale endosarcomerice sînt redate pe scurt în tabelul 8.VII.

Citoscheletul endosarcomeric și problema celui de al treilea tip de filamente. Presupunerea existenței în interiorul sarcomerelor a unui al treilea tip de filamente (în afara celor „clasice", de miozină și actină) s-a făcut de

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 8.VII

Rolurile (posibile) ale citoscheletului endo- şi exosarcomeric

Rol	Reţeaua endosarcomerică *	Reţeaua exosarcomerică **
Structural	Matrice structurală tridimensională de suport pentru filamentele groase şi subţiri	Poziţionarea şi menţinerea miofibrilelor în registru ***
Mecanic	Contribuie la elasticitatea sarcomerului (revenirea sarcomerului la volumul iniţial după contracţie)	Contribuie la elasticitatea fibrei musculare (revenirea la volumul iniţial după contracţie)
Reglator	Legare reversibilă a Ca^{2+} (?)	Juxtapoziţia tubilor T şi a reticulului sarcoplasmic printre miofibrile
Metabolic	Suport pentru enzime	Suport pentru granule de glicogen, mitocondri şi nuclei
În dezvoltare (histogeneză)	Suport (matriţă) pentru asamblarea filamentelor groase şi subţiri în sarcomer	Suport pentru asamblarea miofibrilelor

* Formată din filamente Z-Z, alcătuite din conectină, (sinonim: titină), solidarizate transversal prin nebulină (fig. 8.31).

** Formată din filamente perisarcomerice cu orientarea longitudinală şi din filamente intermiofibrilare cu orientare transversală, care sînt ataşate de costamerele sarcolemei (vezi fig. 8.29 şi 8.30).

*** Poziţionarea miofibrilelor în aşa fel încît benzile A, respectiv I, şi implicit celelalte benzi de la nivelul unei miofibrile să corespundă exact benzilor A şi, respectiv I, de la nivelul miofibrilelor învecinate. Această aşezare în registru dă la microscopul optic aspectul global, striat transversal al fibrei musculare scheletice.

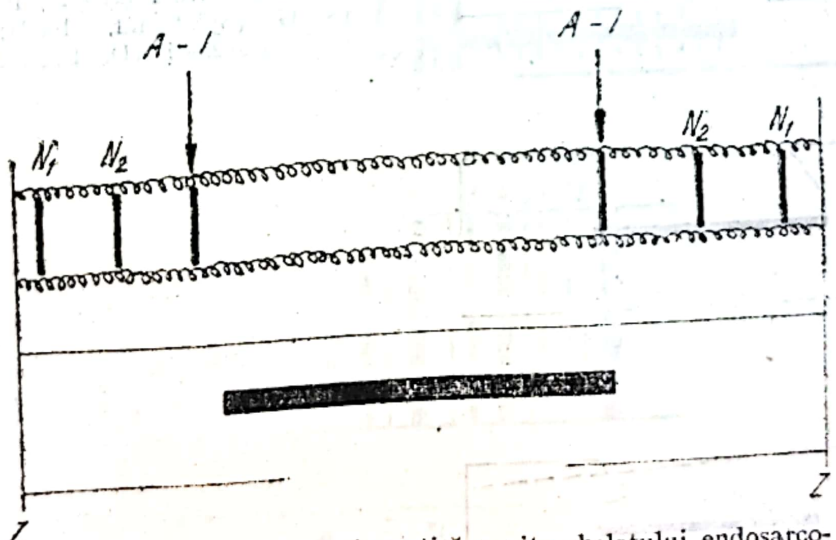


Fig. 8.31. — Reprezentare schematică a citoscheletului endosarcomeric. Pentru simplificare, filamentele Z—Z, care alcătuiesc citoscheletul endosaromeric, sînt desenate separat de filamentele groase şi subţiri. În realitate, filamentele Z—Z se interdigitează cu filamentele groase şi subţiri, intercalîndu-se printre acestea. Între filamentele Z—Z alcătuite din conectină (sinonim: titină; vezi tabelul 8 VI), există legături transversale alcătuite din nebulină, la nivelul benzilor N_1 şi N_2 şi la nivelul joncţiunii dintre banda I şi A.

Scanned with OKEN Scanner

mai multe ori în ultimii 30 de ani (fig. 8.32), de fapt luîndu-se în considerare (mai) toate posibilitățile teoretice. Astfel de extrafilamente propuse sînt următoarele 5 tipuri:

1. *filamente S* (fig. 8.32.1), care ar lega capetele libere ale filamentelor subțiri (Hanson și Huxley, 1956); ulterior această ipoteză a fost abandonată;

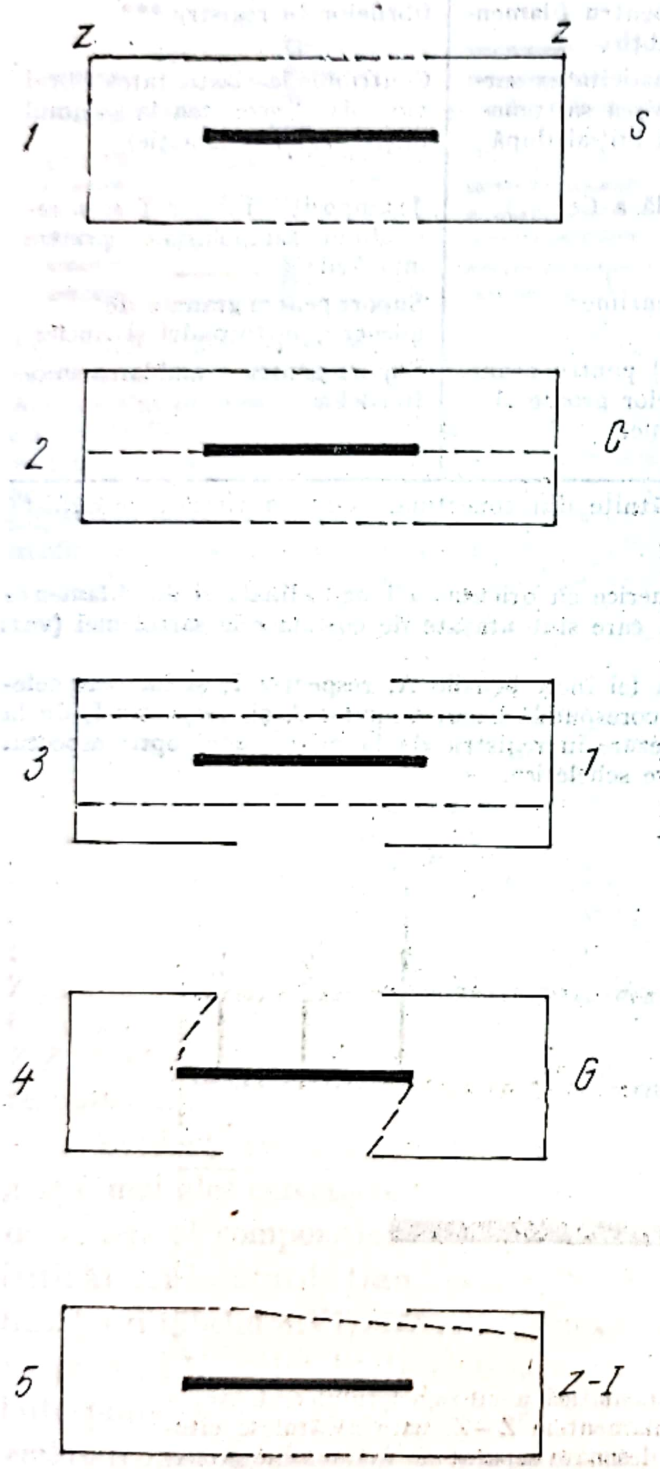


Fig. 8.32. — Tipuri de filamente sugerate de diverși autori ca existînd (?) în sarcomer în afara filamentelor groase (de miozină) și subțiri (de actină). Așa-numitele „al treilea tip de filamente" sînt desenate cu linii întrerupte:
1 — filamente S (Huxley și Hanson, 1956); 2 — filamente C (Couteaux, 1963; Garamvolgyi, 1963; Maruyama și colab., 1984); 3 — filamente T (Hoyle, 1967); 4— filamente G (Sjöstrand, 1962); 5 — filamente Z—I (D. Eremia, 1985).

2. *filamente C* (fig. 8.32 2), care ar lega capetele filamentelor groase de miozină de benzile Z; astfel de filamente au fost descrise de Couteaux (1963), Garamvolgyi (1963) și White (1967) în mușchii striați de insecte.

Scanned with OKEN Scanner

Maruyama și colab. (1984) sugerează prezența lor la mamifere, dar este probabil că ele reprezintă fragmente din filamentele Z-Z ale citoscheletului endosarcomeric (vezi fig. 8.31);

3. *filamente T* (fig. 8.32.3), care ar lega benzile Z între ele (Hoyle, 1967); aceste filamente sînt „precursori" ai filamentelor Z-Z din concepția actuală asupra rețelei endosarcomerice (vezi fig. 8.31);

4. *filamente G* (fig. 8.32.4), care ar lega capetele libere ale filamentelor groase de capetele libere ale filamentelor subțiri (Sjöstrand, 1962);

5. *filamente Z-I* (fig. 8.32.5), care ar lega capetele libere ale filamentelor subțiri de benzile Z opuse (D. Eremia, 1985). Existența acestor filamente a fost doar presupusă teoretic.

Banda M corespunde regiunii din centrul sarcomerului, mijlocul benzii A, în care se găsesc numai filamente groase de miozină și unde acestea nu prezintă punți transversale, din cauza dispoziției antiparalele a moleculelor de miozină.

Ultrastructură. Banda M este greu vizibilă la microscopul optic, dar clar observabilă la microscopul electronic. Ea apare pe imaginile electronomicroscopice (vezi fig. 8.6) alcătuite din 3—5 *substriații majore* (mai groase) și alte cîteva *substriații minore* (mai subțiri). Aceste striații sînt paralele între ele și perpendiculare pe filamentele groase. Numărul și tipul de substriații depind de tipul de fibră musculară (vezi heterogenitatea fibrelor musculare scheletice, fibre roșii și albe) (fig. 8.33). Ultrastructura tridimensională a benzii M a fost clarificată de Knappeis și Carlsen (1968) iar modelul de orga-

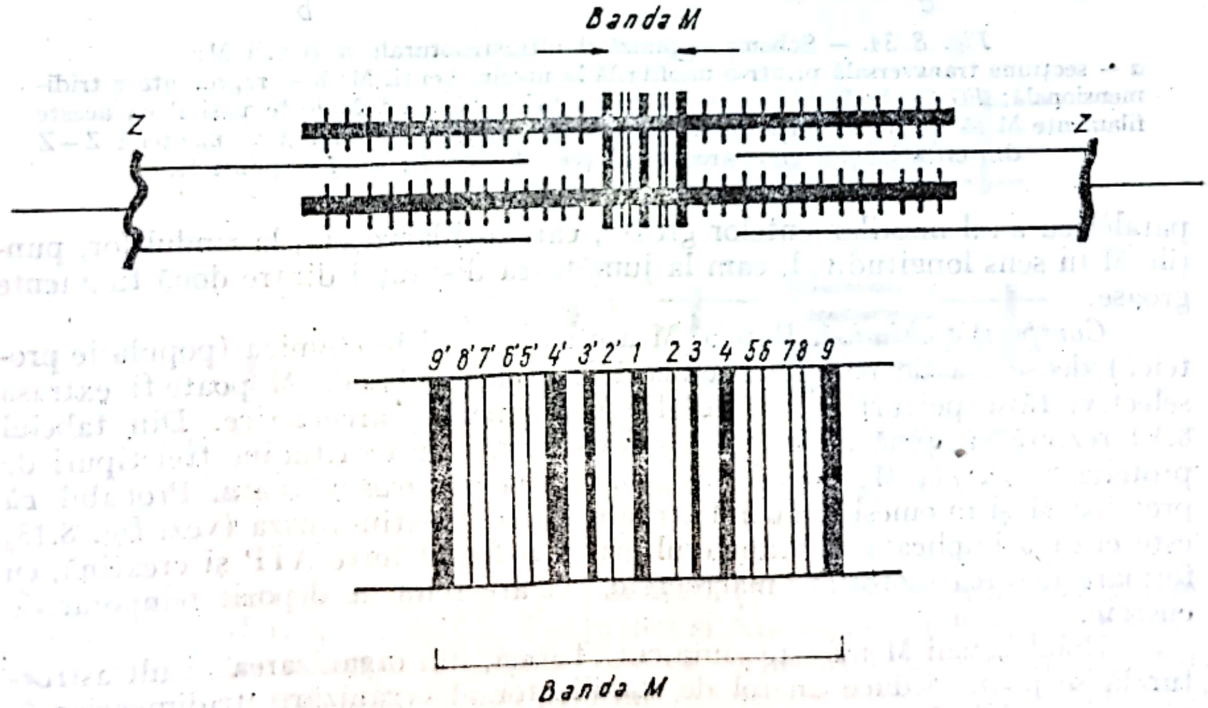


Fig. 8.33. — Nomenclatura substriațiilor benzii M propusă de Sjöström și Squire (1979). În funcție de mușchi și tipul de fibră (de exemplu albă sau roșie), există 3—5 substriații majore (linii groase) și altele minore (linii subțiri), pînă la maximum M9 și M9' la extremitățile benzii M. În exemplul din figură (cazul mușchiului sartorius de broască) există trei substriații majore: M1, M4 și M 4'.

Scanned with OKEN Scanner

nizare propus de ei a fost confirmat ulterior. Aspectul striat al benzii M se datorește prezenței unor punți *M* (fig. 8.34 a și b), groase de circa 4 nm, care conectează filamentele groase de miozină între ele în sens transversal, realizînd pe secțiuni transversale adevărate desene hexagonale. Knappeis și Carlsen au mai descris și *filamente M*, cu grosimea de 5—6 nm, orientate

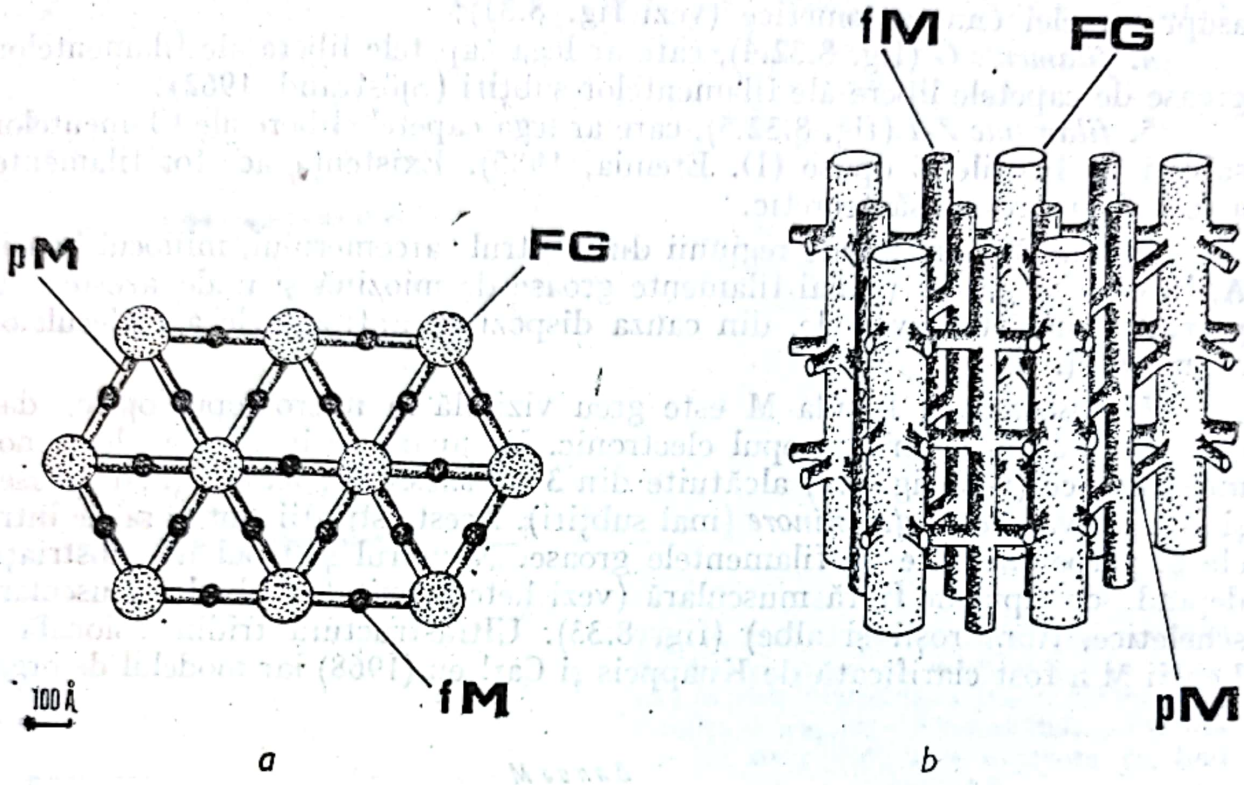


Fig. 8.34. — Schema organizării ultrastructurale a benzii M: *a* — secțiune transversală printr-o miofibrilă la nivelul benzii M; *b* — reprezentare tridimensională; *FG* — filament gros de miozină; *fM* — filament M (este posibil ca aceste filamente M să fie în realitate porțiunea care traversează banda I a filamentelor Z—Z din citoscheletul endosarcomeric) (vezi fig. 8.31); *pM* — punți M.

paralel cu axul miofilamentelor groase, care solidarizează, la rîndul lor, punțile M în sens longitudinal, cam la jumătatea distanței dintre două filamente groase.

Compoziție chimică. Banda M are o compoziție chimică (populație proteică) deosebită de restul sarcomerului, deoarece banda M poate fi extrasă selectiv, fără perturbarea celorlalte componente sarcomerice. Din tabelul 8.VI rezultă că, pînă acum, au fost evidențiate cu certitudine trei tipuri de proteine în banda M: *proteine M*, *miomesina* și *creatin-kinaza*. Probabil că proteina M și miomesina au rol structural, iar creatin-kinaza (vezi fig. 8.13) este enzima implicată în transferul grupării fosfat între ATP și creatină, cu formare de creatinofosfat macroergic, ce are rolul de depozit temporar de energie.

Rolul benzii M nu este cunoscut. Totuși, din organizarea ei ultrastructurală se poate deduce un rol de stabilizator al organizării tridimensionale a sarcomerului. Banda M este probabil responsabilă de menținerea poziției relative a filamentelor groase de miozină unele față de altele în centrul sarcomerului, solidarizîndu-le prin punțile M. Banda M nu este o condiție *sine qua non* pentru contracție, deoarece fibrele musculare striate din care s-au extras selectiv benzile M se contractă (L. M. Popescu, observații nepublicate).

Scanned with OKEN Scanner

Cu toate că actualmente nu există nici o îndoială că interacțiunea dintre actină și miozină în prezența ATP-ului reprezintă evenimentul esențial al contracției, afirmația făcută cu aproape 50 de ani în urmă de Engelhardt: „Au existat probabil tot atîtea teorii asupra contracției musculare cîți cercetători s-au ocupat de acest subiect" — își păstrează aparent valabilitatea și astăzi. Motivul principal pentru care cele mai multe ipoteze explicative asupra mecanismului contracției musculare eșuează, este că ele trebuie să ofere baze de interpretare pentru prea multe fenomene printr-un singur mecanism sau, altfel spus, satisfac numai cunoștințele autorului lor. Din această cauză, istoria încercărilor de descifrare a mecanismelor care stau la baza contracției musculare este un adevărat „cimitir al ipotezelor premature". În cele ce urmează nu ne propunem să inventariem teoriile și ipotezele emise în legătură cu contracția musculară și nici să urmărim succesiunea de enunțări, renunțări, reveniri și reevaluări de idei asupra mecanismelor contracției, care se perpetuează de mai multe decenii, ci vom prefera o sistematizare simplă. Astfel, se pot deosebi două mari grupuri de teorii, care corespund de altfel celor două posibilități teoretice de realizare a scurtării mușchiului: teorii care implică *scurtarea filamentelor* și teorii care implică *glisarea filamentelor*. Deoarece există dovezi clare, obținute prin difracție cu raze X, care arată că lungimea filamentelor nu variază în funcție de starea mușchiului (relaxare, contracție sau intindere), ipotezele care sugerează scurtarea filamentelor de miozină și/sau actină în timpul contracției trebuie privite actualmente ca avînd numai importanță istorică.

Contracția musculară constă în alunecarea și întrepătrunderea filamentelor subțiri de actină printre filamentele groase de miozină * (fig. 8.35). La baza stabilirii mecanismului întrepătrunderii și alunecării filamentelor au stat observațiile electronomicroscopice și în contrast de fază asupra fibrelor musculare

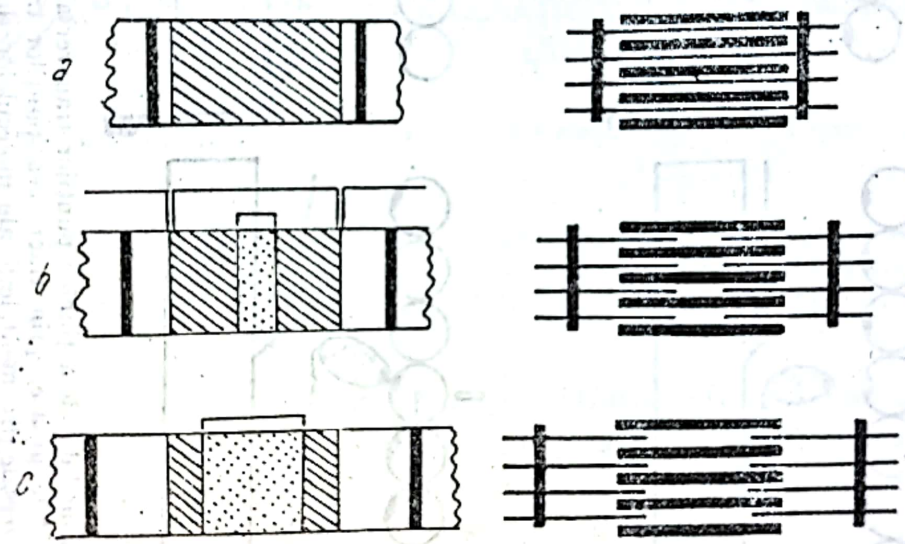


Fig. 8. 35. — Aspectul miofibrilei striate în cazul mușchiului contractat *(a)*, relaxat *(b)* și întins *(c)*: modificările de bandare în microscopie optică *(stînga)* și poziția relativă a miofilamentelor groase și subțiri în microscopie electronică *(dreapta)*.

izolate, efectuate de H. E. Huxley și Hanson (1954), și cercetările de microscopie cu interferență ale lui A. F. Huxley și Niedergerke (1954) asupra celulelor musculare intacte. Concluzia faptică principală a acestor cercetări a fost că dimensiunile benzii A rămîn constante în cursul contracției sau întinderii fibrelor musculare și că scurtarea miofibrilelor are la bază o

* Alunecarea și întrepătrunderea filamentelor subțiri printre filamentele groase *nu* este o teorie a contracției musculare, ci o constatare experimentală. Ipoteză sau teorie a mecanismului contracției musculare înseamnă, în ultimă instanță, o ipoteză sau o teorie asupra mecanismului care determină alunecarea și întrepătrunderea filamentelor.

Scanned with OKEN Scanner

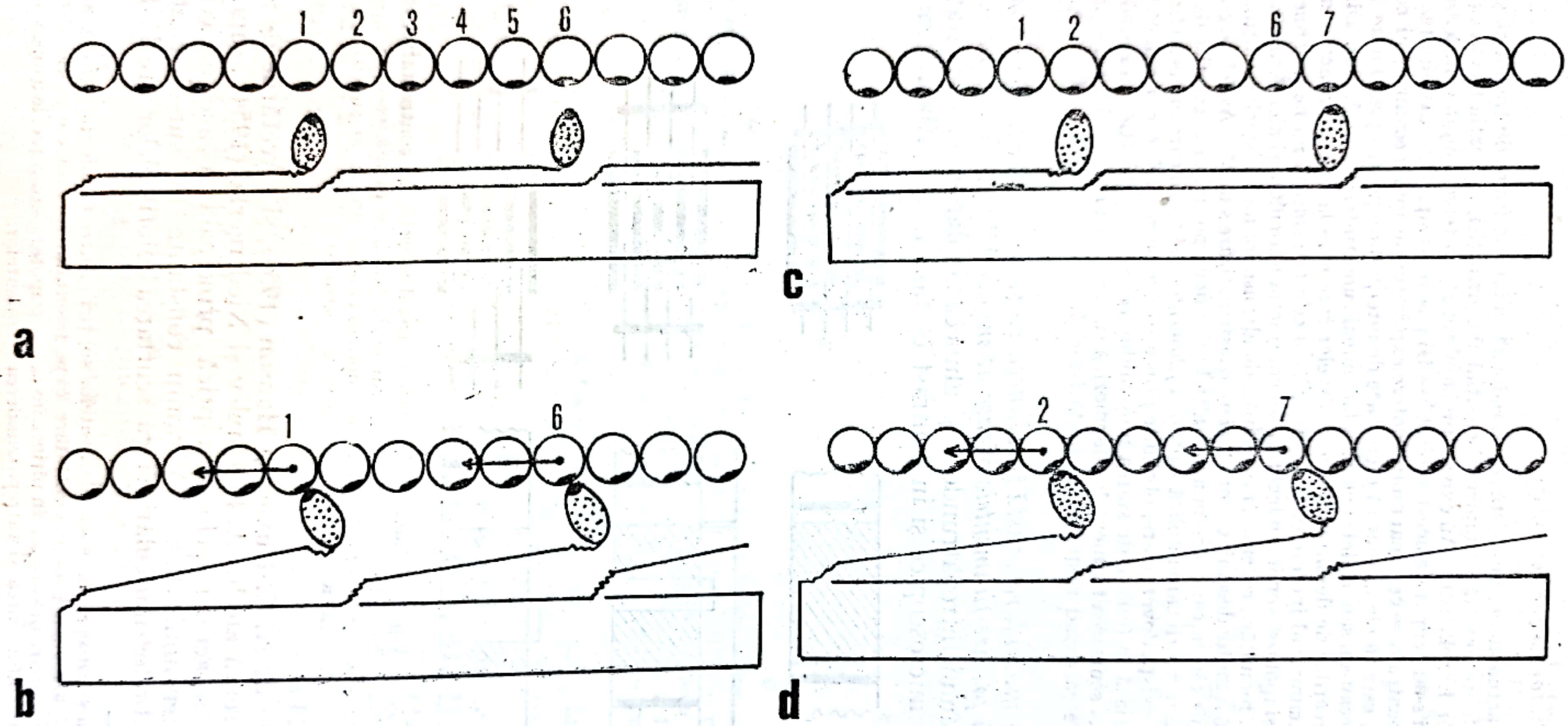


Fig. 8. 36. — Reprezentare simplificată a modului de acțiune a punților transversale (punctate) în mecanismul de alunecare a filamentelor subțiri printre filamentele groase, prin tracțiunea punților transversale. Ciclul punților transversale: *a* — în stare de relaxare punțile transversale (fragmentele S_1 ale moleculelor de miozină) nu sînt atașate de filamentul de actină (figurat ca polimer al sferelor de actină globulară); *b* — la începutul contracției punțile transversale se atașează de filamentele de actină sub un anumit unghi și modificarea lor conformațională (intrinsecă) propulsează filamentul de actină către centrul sarcomerului; *c* — apoi punțile transversale se detașează de filamentul de actină și *d* — se reatașează de filamentul de actină pe următorul monomer de actină globulară.

Scanned with OKEN Scanner

scurtare a benzilor I. De aici corolarul: scurtarea sau alungirea mușchiului este rezultatul deplasării filamentelor subțiri printre filamentele groase, dimensiunile și forma filamentelor rămînînd constante (vezi fig. 8.35).

În ceea ce privește explicarea mecanismului care determină glisarea filamentelor subțiri printre filamentele groase, teoria cea mai acceptată (dar nu universal acceptată !) actualmente este *teoria punților transversale* (fig. 8.36 și 8.37), propusă independent de H. E. Huxley și A. F. Huxley în 1957 și susținută în repetate rînduri ulterior. În esență, această teorie susține formarea și desfacerea ciclică repetitivă a unor legături între punțile transver-

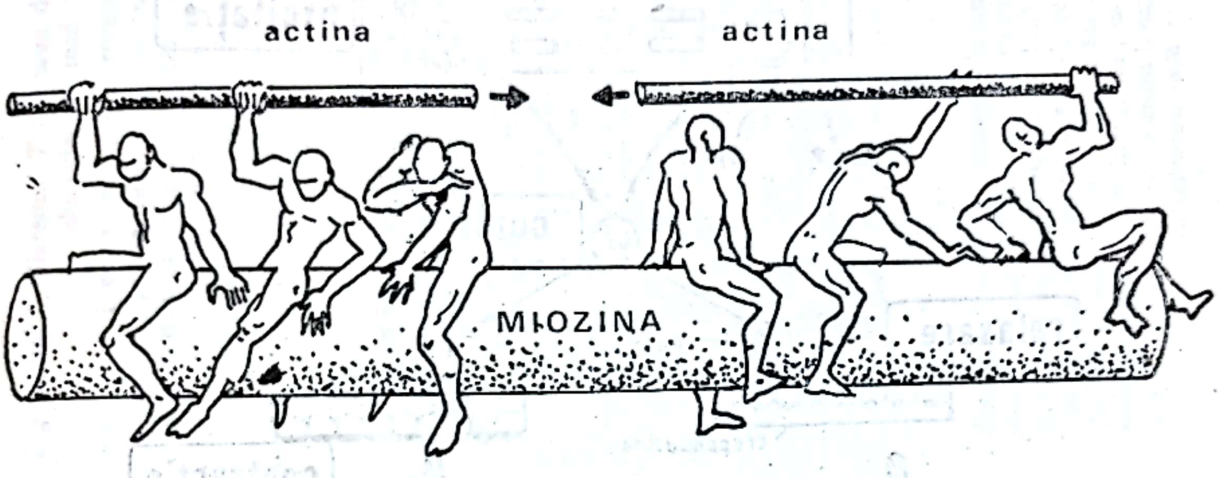


Fig. 8. 37. — Analogie antropomorfică a rolului punților transversale în tracțiunea filamentelor subțiri.

sale și filamentele subțiri. La fiecare ciclu de atașare-detașare a punților transversale s-ar realiza o mișcare a filamentelor subțiri spre centrul sarcomerului cu circa 5—10 nm, corepunzînd lungimii unei unități de G-actină, din filamentul subțire.

8.2.1.2.4.2. *Reticulul sarcoplasmic și cuplarea excitație-contracție*

Termenul cuplare excitație-contracție (fig. 8.38) se referă la mecanismul prin care impulsul electric de la nivelul sarcolemei produce contracția miofibrilelor din interiorul fibrei. Rolurile esențiale în relizarea cuplării excitație-contracție revin sistemului T (fig. 8.39) și reticulului sarcoplasmic (fig. 8.40). Secvența de fenomene care au loc în cursul cuplării excitație-contracție este următoarea:

— sistemul T conduce potențialul de acțiune de la nivelul sarcolemei adînc în interiorul fibrei musculare pînă în vecinătatea reticulului sarcoplasmic care înconjură miofibrilele;

— ca urmare a semnalului primit de reticulul sarcoplasmic de la tubii T, ionii de Ca^{2+} depozitați în interiorul reticulului sarcoplasmic sînt eliberați prin canalele de Ca^{2+} ale membranei reticulului sarcoplasmic în sarcoplasmă;

— declanșarea contracției ca urmare a creșterii concentrației sarcoplasmice a ionilor de Ca^{2+} liberi de la 10^{-7} M la 10^{-6} M, sau chiar 10^{-5} M, prin intermediul proteinei receptor pentru Ca^{2+}, troponina C;

— reacumularea ionilor de Ca^{2+} în reticulul sarcoplasmic prin intervenția pompei de Ca^{2+} (Ca^{2+}-ATP-aza), din membrana reticulului sarcoplasmic, care acumulează Ca^{2+} în interiorul reticulului sarcoplasmic, scăzînd astfel concentrația sarcoplasmică de Ca^{2+} și implicit producînd din nou relaxarea.

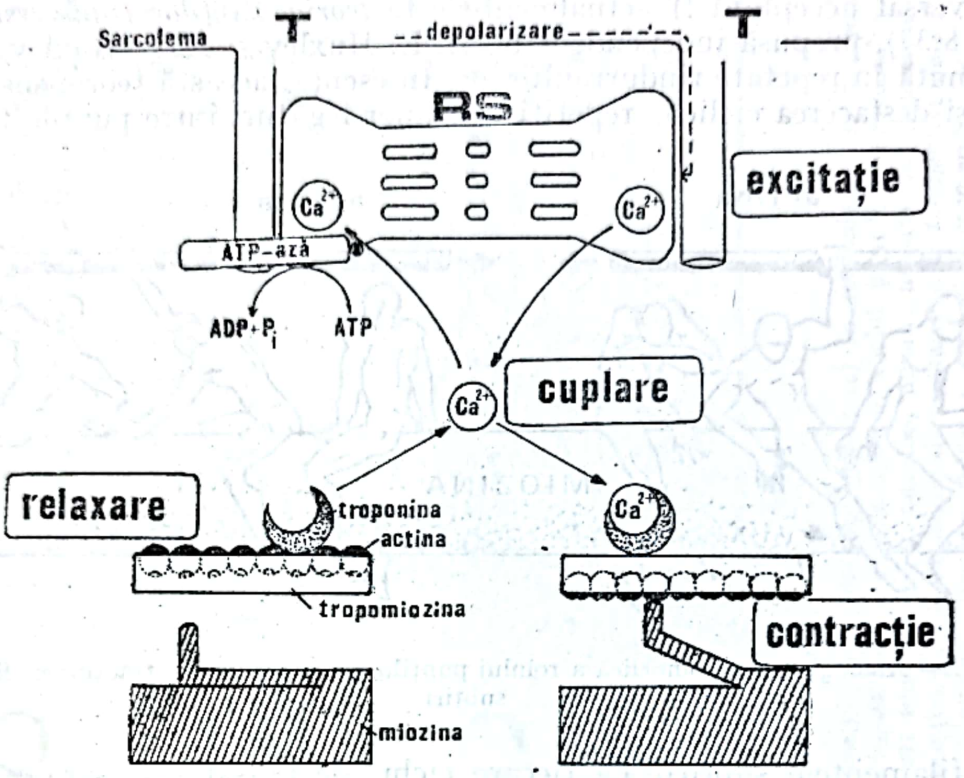


Fig. 8. 38. — Schema fenomenului de cuplare excitație-contracție. Semnalul fiziologic activator, reprezentat de unda de depolarizare, pătrunde în interiorul fibrei prin tubii T, de unde este transmis cisternelor terminale ale reticulului sarcoplasmic *(RS)*, producînd eliberarea Ca^{2+} care difuzează spre miofibrile și este legat de troponina C, inițiind contracția. Ulterior, reticulul sarcoplasmic „sustrage" Ca^{2+} de la nivelul miofibrilelor reacumulîndu-l în interiorul său prin intervenția activă a pompei de Ca^{2+} (Ca^{2+} — ATP-aza) și astfel miofibrilele revin la starea de relaxare.

Clasificarea reticulului sarcoplasmic din fibra musculară scheletică (vezi fig. 8.40 și fig. 8.41). Reticulul sarcoplasmic din fibrele musculare scheletice este un exemplu tipic de specializare funcțională a reticulului endoplasmic și de aceea trebuie considerat ca un organit specific pentru fibra musculară scheletală. Actualmente, se descriu două porțiuni în alcătuirea reticulului sarcoplasmic din fibra musculară scheletică: reticulul sarcoplasmic joncțional, care stabilește contacte strînse cu tubii T, și reticulul sarcoplasmic așa-zis liber, care nu stabilește contacte cu tubii T.

Reticulul-sarcoplasmic joncțional este reprezentat de *cisternele terminale*, specializări locale ale reticulului sarcoplasmic care constau în porțiuni dilatate ale acestuia. De regulă, cisternele terminale sînt așezate cîte două de o parte și de alta a unui tub T, formînd ceea ce se numește o triadă (fig. 8.42). Este de remarcat că zona de contact dintre cisternele terminale și tubul de la nivelul triadei are o configurație ultrastructurală specială. Electronomicroscopic, folosindu-se tehnici speciale de fixare, s-au putut evidenția cone-

Scanned with OKEN Scanner

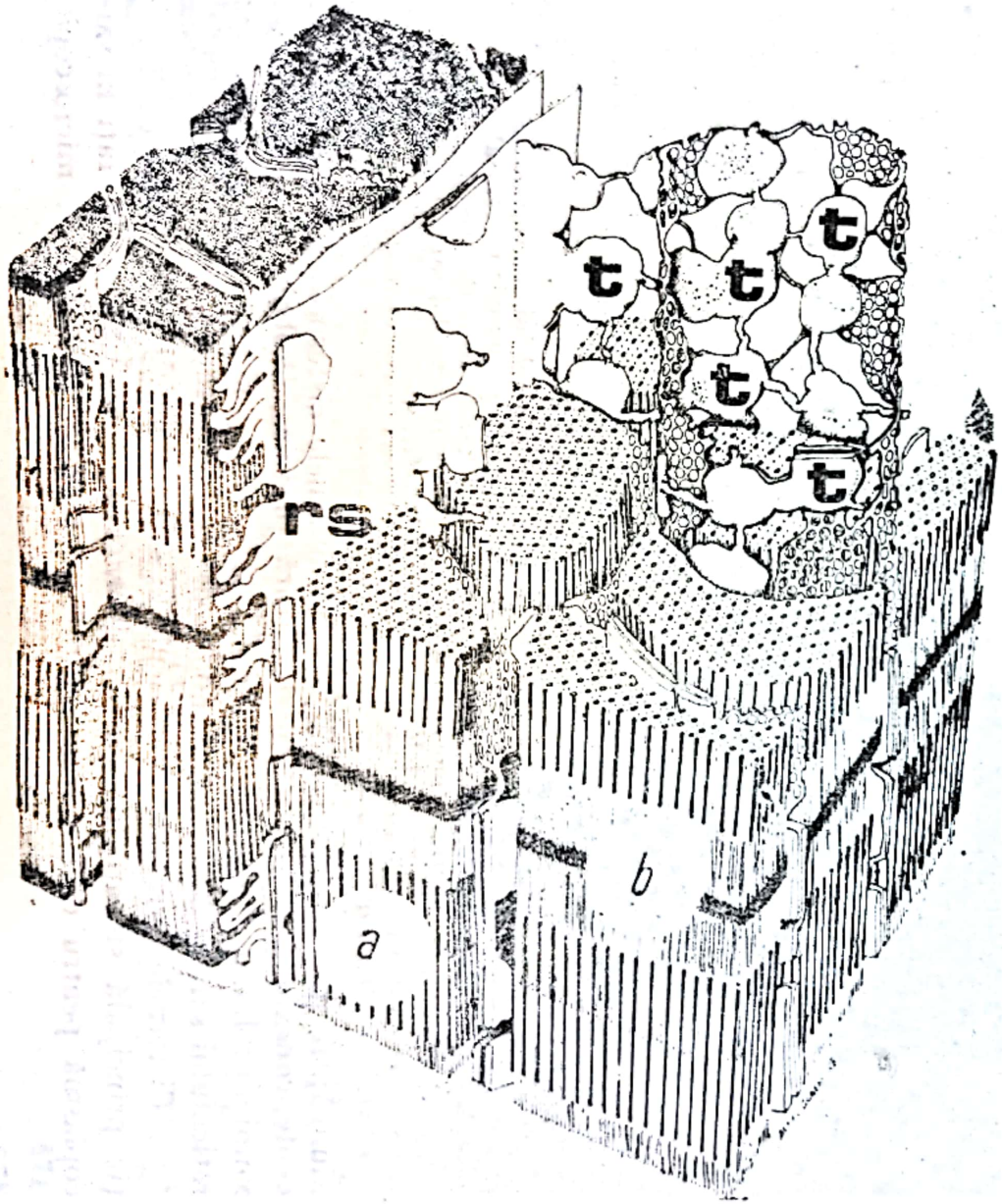


Fig. 8. 39. — Sistemul T (rețeaua de tubi T) este alcătuit din două feluri de porțiuni care alternează:

a — tubi înguști, cu profil rotund-ovalar în secțiune transversală, care nu stabilesc contacte cu reticulul sarcoplasmic, și *b* — porțiuni dilatate sau turtite care formează joncțiuni cu reticulul sarcoplasmic; *rs* — reticul sarcoplasmic.

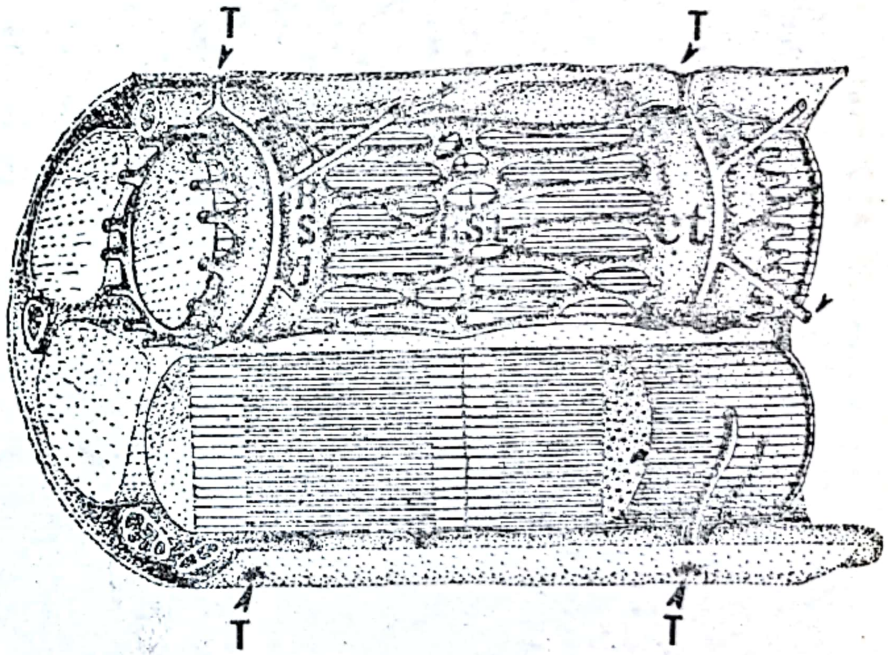


Fig. 8. 40. — Reprezentare schematică a organizării reticulului sarcoplasmic din fibrele musculare striate de mamifere. Reticulul sarcoplasmic apare format din două componente principale: *RSJ* — reticul sarcoplasmic joncțional, reprezentat de cisternele terminale *(ct)* care stabilește contacte strînse cu tubi T, și *RSL* — reticul sarcoplasmic liber nejoncțional, care nu stabilește contacte cu tubii T și este reprezentat de tubii longitudinali care formează o rețea ce interconectează cisternele terminale.

Scanned with OKEN Scanner

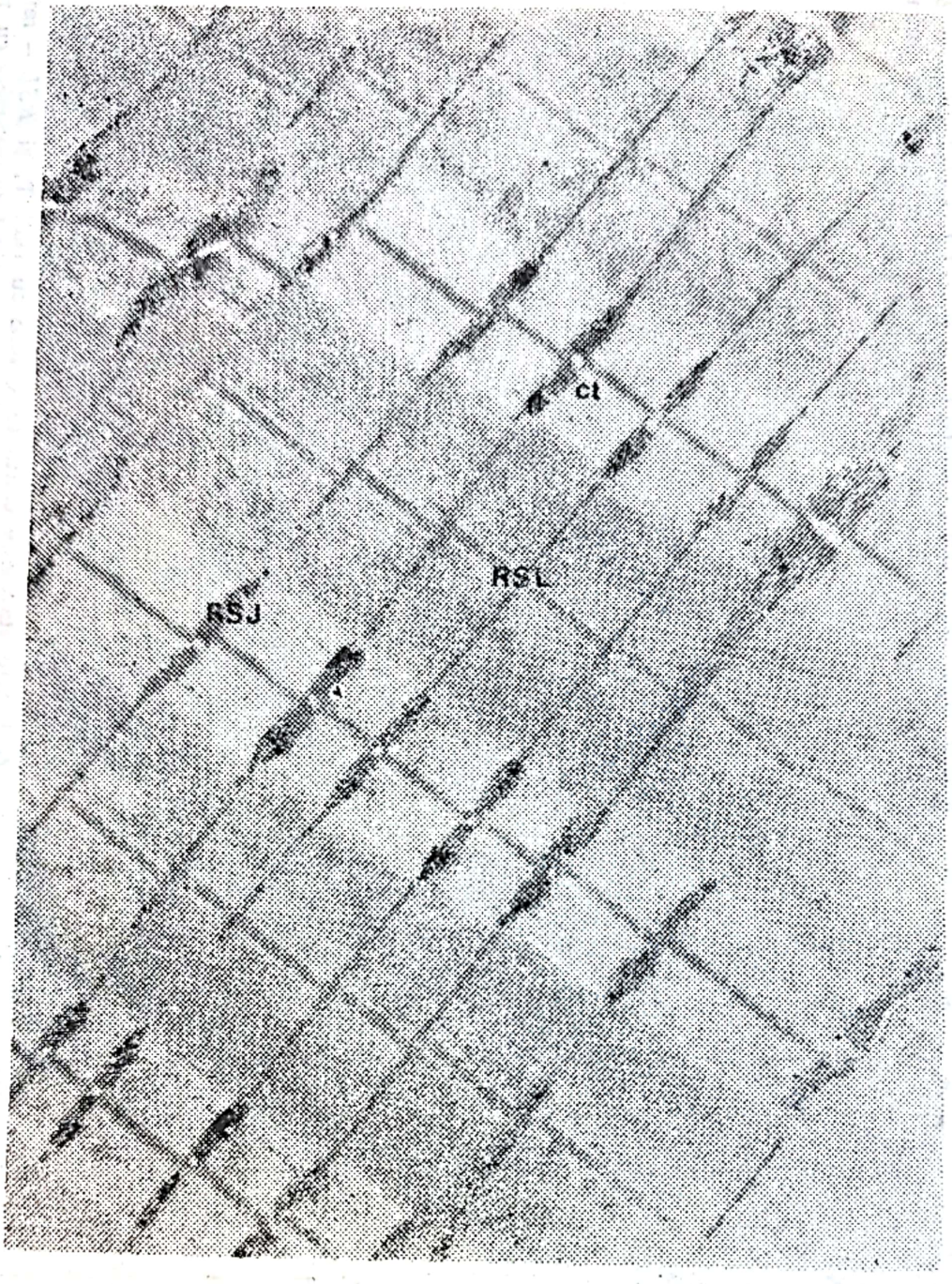


Fig. 8.41. — Imagine electronomicroscopică a reticulului sarcoplasmic din mușchiul sartorius de broască: *RSJ* — reticul sarcoplasmic joncțional; *CT* — cisterne terminale; *RSL* — reticul sarcoplasmic liber. Reacție ultracitochimică pentru demonstrarea localizării Ca^{2+} în reticulul sarcoplasmic folosind oxalatul ca *marker*.

xiuni între membrana tubului T și membranele cisternelor terminale adiacente, conexiuni care par să fie de natură proteică. Probabil că aceste conexiuni au rolul de a transmite semnalul de la tubii T la cisternele terminale ale reticulului sarcoplasmic avînd funcție de senzori electrici.

Cisternele terminale ale reticulului sarcoplasmic joncțional au ca funcție principală stocarea ionilor de calciu, care urmează să fie eliberați în sarcoplasmă pentru declanșarea contracției. Cercetări recente de microscopie

Scanned with OKEN Scanner

electronică, analitică cu raze X (A. V. Somlyo și colab., 1977; L. M. Popescu și colab., 1980) au permis măsurarea cantității de calciu stocate în interiorul cisternelor terminale. Astfel, s-a putut determina o valoare de cca 100 mmoli

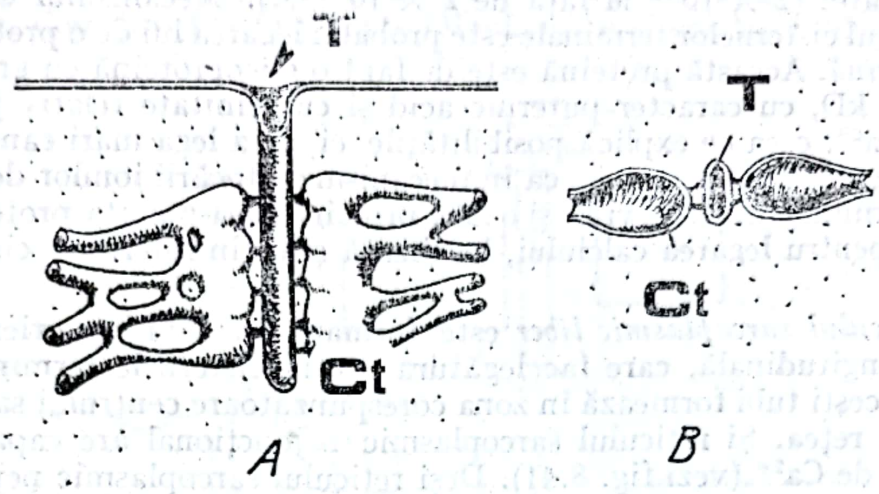


Fig. 8. 42. — Alcătuirea unei triade din fibra musculară scheletică constînd în asocierea unui tub T cu două cisterne terminale alăturate: *A* — vedere din față; *B* — secțiune transversală prin tubul T. Se remarcă prezența de conexiuni între membrana tubului T și a cisternelor terminale.

Ca/kg greutate uscată în interiorul cisternelor terminale (fig. 8.43), ceea ce corespunde unei concentrații a ionilor de Ca^{2+} de cca 20 mM în cisternele ter-

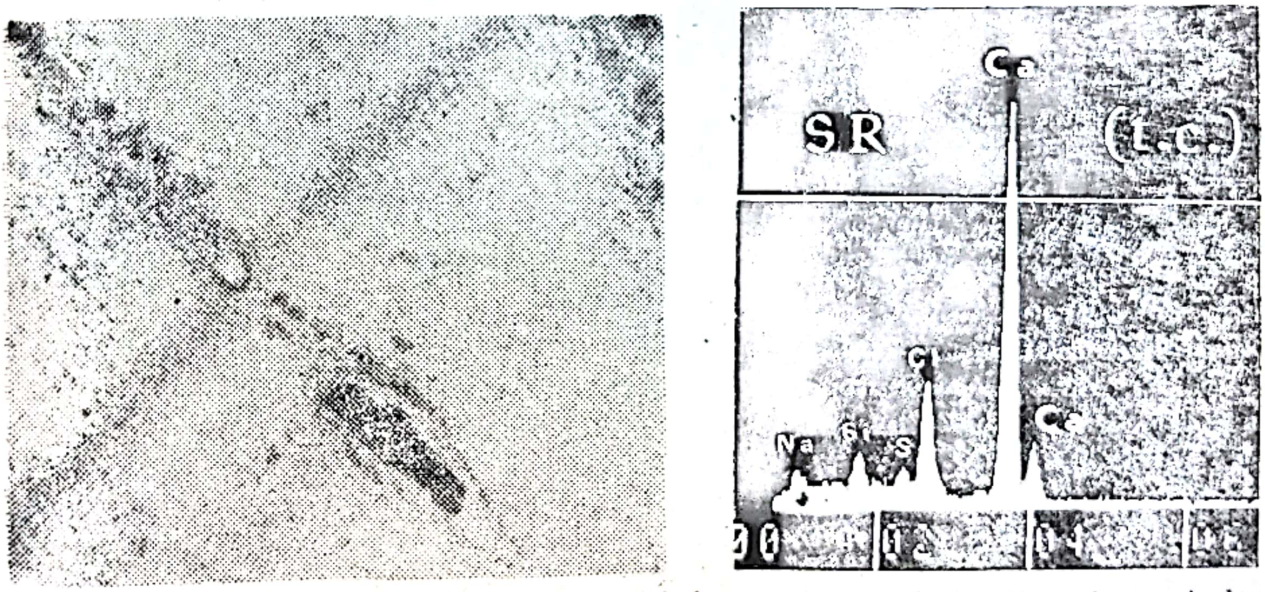


Fig. 8. 43. — Imagine electronomicroscopică arătînd acumularea Ca^{2+} în cisternele terminale: stînga — depozit electronoopac de oxalat de calciu în interiorul unei cisterne terminale, format ca urmare a tratamentului fibrei musculare cu oxalat de potasiu care precipită ionii de Ca^{2+}. Probabil că ionii de Ca^{2+} precipitați cu oxalat au fost legați în interiorul cisternei terminale de calsechestrină. Conținutul de calciu al acestei cisterne terminale a fost măsurat prin microscopie electronică analitică cu raze X, valoarea obținută fiind 97 mmoli Ca/kg greutate uscată, ceea ce corespunde la o concentrație de cca 20 mM Ca^{2+} în cisterna terminală a fibrei musculare vii; dreapta — spectru al compoziției chimice elementale a cisternei terminale, obținut prin microscopie electronică analitică cu raze X. Se remarcă vîrful semnificativ, corespunzînd energiei 3,7 keV caracteristic pentru Ca. Prezența vîrfurilor pentru Cl și Si sînt artefacte datorate prezenței unei cantități mari de Cl în materialul de incluzie (Epon) și, respectiv, a Si în accesoriile intrumentale.

Scanned with OKEN Scanner

minale din fibra musculară scheletică vie. Rezultă astfel că, concentrația ionilor de Ca^{2+} în interiorul cisternelor terminale este de cca 100 000 de ori mai mare decît concentrația ionilor de Ca^{2+} liberi din sarcoplasma fibrei musculare relaxate: (2×10^{-2} M față de 2×10^{-7} M). Mecanismul stocării Ca^{2+} în interiorul cisternelor terminale este probabil legarea lui de o proteină numită *calsechestrină*. Această proteină este de fapt o glicoproteină cu greutate moleculară 45 kD, cu caracter puternic acid și cu afinitate relativ joasă pentru ionii de Ca^{2+}, ceea ce explică posibilitățile ei de a lega mari cantități de calciu. Este posibil de asemenea ca în mecanismul stocării ionilor de Ca^{2+} în cisternele terminale să intervină și o altă proteină, așa-numita proteină cu mare afinitate pentru legarea calciului, localizată și ea în interiorul cisternelor terminale.

Reticulul sarcoplasmic liber este format din tubi cu orientare predominant longitudinală, care fac legătura dintre cisternele terminale. În mod obișnuit acești tubi formează în zona corespunzătoare centrului sarcomerului o adevărată rețea. Și reticulul sarcoplasmic nejoncțional are capacitatea de a stoca ioni de Ca^{2+} (vezi fig. 8.41). Deși reticulul sarcoplasmic nejoncțional nu stabilește contacte cu tubii T, totuși cercetări recente (I. Diculescu, observații nepublicate) arată că acesta poate stabili contacte cu caveolele subsarcolemale (fig. 8.44).

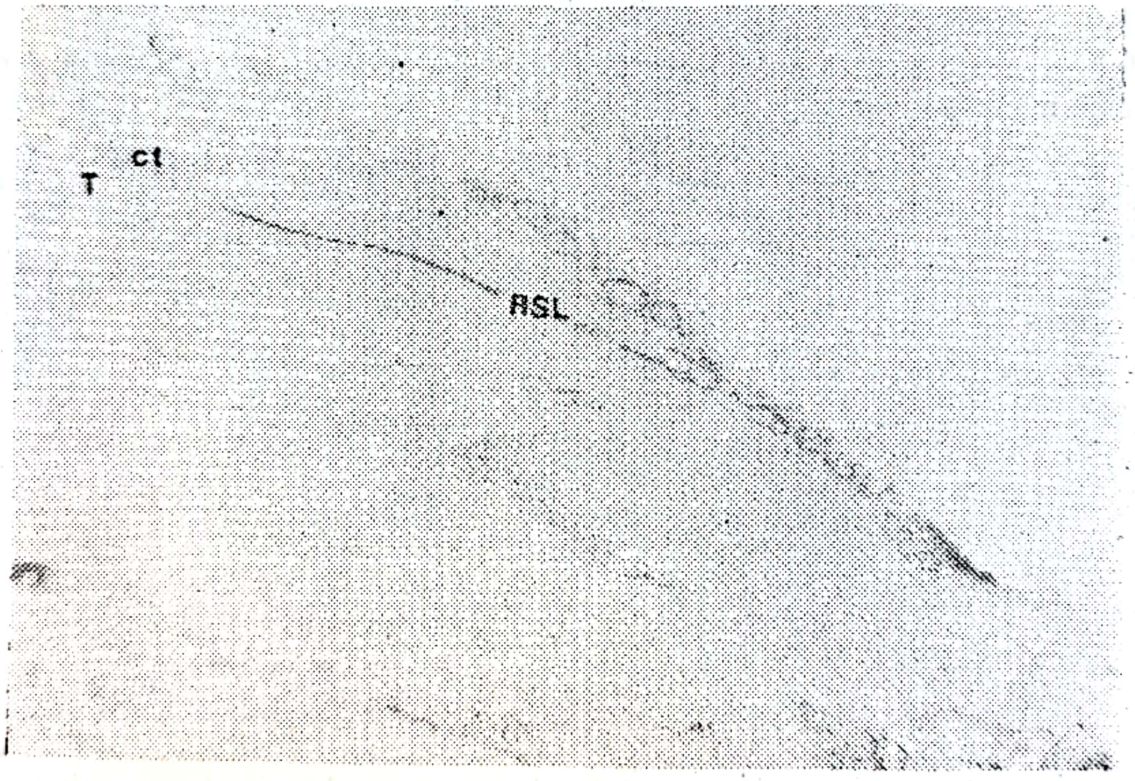


Fig. 8.44. — Imagine electronomicroscopică care arată legătura dintre reticulul sarcoplasmic liber *(RSL)*, nejoncțional, și caveolele subsarcolemale: *T* — secțiune transversală printr-un tub T; *ct* — cisternă terminală (din colecția Prof. I. Diculescu).

Mecanismul acumulării Ca^{3+} în reticulul sarcoplasmic — pompa de Ca^{2+}. Acumularea Ca^{2+} în interiorul reticulului sarcoplasmic din sarcoplasmă are loc contra unui gradient de concentrație formidabil (10 000 pînă la 100 000). Mecanismul molecular are ca substrat o Ca^{2+}—ATP-ază cu funcție de pompă

Scanned with OKEN Scanner

de Ca^{2+}, care este o proteină transmembranară cu greutatea moleculară de 100 kD. Această enzimă-pompă are o localizare caracteristică în membrana reticulului sarcoplasmic, cea mai mare parte din molecula ei fiind expusă spre versantul sarcoplasmic. Cercetări foarte recente (MacLennan și colab., 1985) au permis

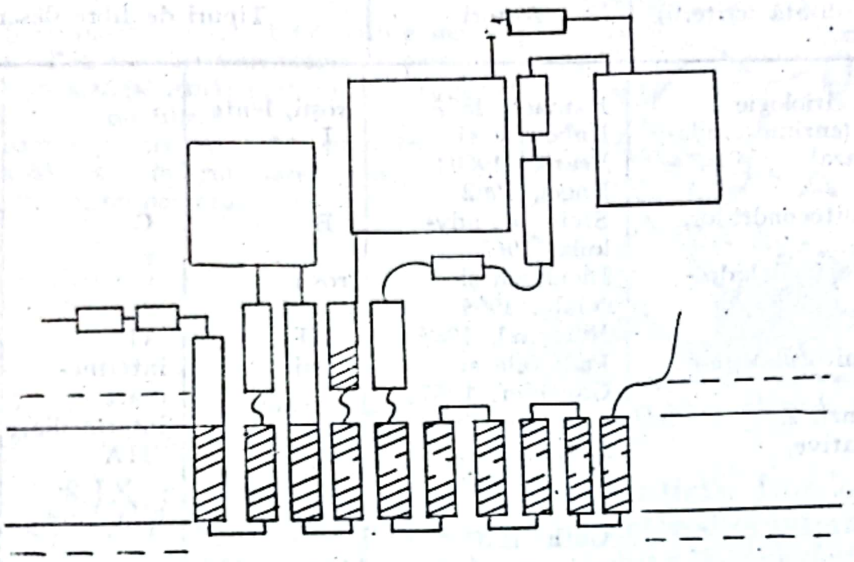


Fig. 8.45. — Alcătuirea moleculei Ca^{2+}-ATP-azei (pompa de Ca^{2+}) din membrana reticulului sarcoplasmic: se remarcă dispoziția clar asimetrică a moleculei transmembranare de Ca^{2+}-ATP-ază, avînd cea mai mare parte din moleculă expusă spre versantul sarcoplasmic (după D. Mac Lennan și colab., 1985).

stabilirea secvenței aminoacizilor în molecula de pompă de calciu a membranei reticulului sarcoplasmic (fig. 8.45). Stoichiometria de funcționare a acestei pompe este hidroliza unei molecule de ATP pentru fiecare doi ioni de Ca^{2+} translocați.

8.2.1.3. Heterogenitatea fibrelor musculare scheletice și clasificarea lor

Se știe de multă vreme că mușchii scheletici diferă din punctul de vedere al culorii macroscopice, anumiți mușchi apărînd mai roșii decît alții. De aceea mușchii scheletici au fost împărțiți în roșii și albi, iar fibrele musculare componente au fost clasificate, la rîndul lor, în roșii și albe. Uzual, se distinge și o a treia categorie de fibre -fibre intermediare sau „roz"! În forma cea mai simplă de clasificare se consideră că fibrele roșii sînt lente și cele albe, rapide. Situația reală este însă mult mai complicată și există numeroase alte clasificări. Spre exemplu, unii autori descriu pînă la 8 tipuri de fibre musculare scheletice, iar alții sînt de părere că nu avem de-a face cu cîteva categorii distincte de fibre musculare scheletice, realitatea constînd într-un spectru continuu și dinamic de varietăți de fibre musculare scheletice.

Criterii de clasificare. Tabelul 8.VIII prezintă comparativ principalele clasificări ale tipurilor de fibre musculare scheletice și terminologia utilizată de diferiți autori, care au folosit metode de cercetare și criterii de apreciere

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 8.VIII

Terminologia utilizată de diverşi autori pentru a descrie tipurile de fibre musculare scheletice la mamifere (şi om)

Metodologia utilizată (criterii)	Autori	Tipuri de fibre descrise		
Histologie şi fiziologie	Ranvier, 1873	roşii, lente		albe, rapide
Histochimie (enzime oxidative, fosforilaza)	Dubowitz şi Pearse, 1960; Engel, 1962	I		II
Distribuţia mitocondriilor, ATP-aza	Stein şi Padykula, 1962	B	C	A
Histoenzimologia dehidrogenazelor	Diculescu şi colab., 1964	roşii		albe
Histochimie	Romanul, 1964	III	II	I
Distribuţia mitocondriilor	Padykula şi Gauthier, 1967	roşii	intermediare	albe
Grosimea benzii Z	Gauthier, 1969	roşii	intermediare	albe
Enzime oxidative, ATP-aza	Brooke şi Keiser, 1970	I	IIA	IIB
	Yellin şi Guth, 1970	beta	alfa, beta	alfa
	Ashmore şi Doerr, 1971	beta-roşii	alfa-roşii	alfa albe
Structura moleculei de miozină (tipuri de lanţuri uşoare)	Sarkar şi colab., 1971	roşii		albe
Fiziologia şi histochimia unităţii motorii	Burke şi colab., 1971	SR lente, rezistente la oboseală	FR rapide, rezistente la oboseală	FF rapide, obosesc uşor
Grosimea benzilor Z şi M corelată cu date citochimice	Sjöström şi colab., 1982	I	IIA	IIB
Grosimea benzii Z, volumul mitocondriilor şi al cisternelor terminale	Eisenberg, 1983	lente-oxidative	rapide, oxidative, glicolitice	rapide, glicolitice

foarte diferite. Din acest tabel rezultă că, operaţional, o clasificare a fibrelor musculare scheletice în trei categorii, şi anume roşii, intermediare şi albe, este posibilă şi utilă, mai ales că are aplicaţii clinice directe în diagnosticul unor boli neuromusculare.

Criterii practice. Din punctul de vedere strict al practicii mediacle (diagnosticul miopatiilor folosind biopsii musculare) sînt de luat în considerare două tipuri de criterii: cel *histoenzimologic* şi cel *morfologic, ultrastructural*. Figura 8.46 prezintă schematic o reacţie histoenzimologică pentru succinatdehidrogenază, pe baza căreia fibrele musculare scheletice apar uşor de încadrat în cele trei categorii: roşii, intermediare şi albe. Folosind microscopia electronică, cele mai bune criterii de discriminare a fibrelor musculare scheletice sînt: *a)* volumul ocupat de mitocondrii şi repartiţia lor intracelulară, *b)* grosimea benzilor Z şi *c)* volumul ocupat de cisternele terminale ale reticulului sarcoplasmic. De fapt, aceste trei criterii morfologice reprezintă cîte un parametru caracteristic pentru fiecare dintre cele trei sisteme componente importante ale unei fibre musculare scheletice: volumul ocupat de mitocondrii pentru sistemul metabolic, grosimea benzilor Z pentru substratul contractil şi volumul cisternelor terminale pentru sistemul de cuplare excitaţie-contracţie. Trebuie totuşi remarcat faptul că determinarea volumului ocupat de mitocondrii sau de cisternele terminale implică determinări

Scanned with OKEN Scanner

morfometrice precise, care consumă un timp relativ îndelungat. De aceea credem că un criteriu care ar putea intra în practică, ar putea fi diagnosticul diferențial fibră roșie/fibră albă

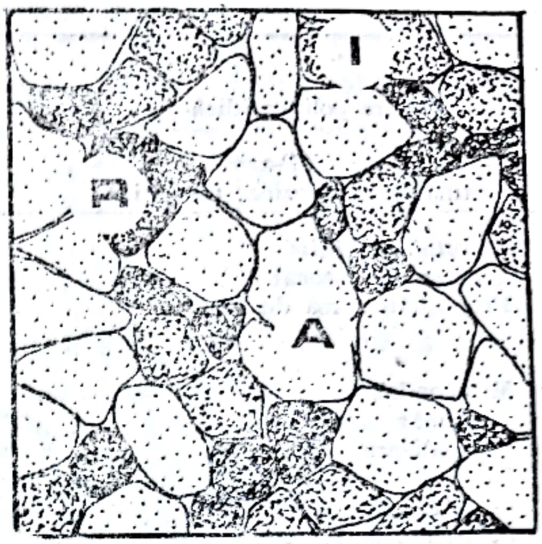


Fig. 8. 46. — Secțiune transversală prin fibre musculare striate. Reacție histoenzimologică pentru succinatdehidrogenază (schemă) arătînd trei tipuri de fibre:
R — roșii (reacție puternică); *A* — albe (reacție foarte slabă); *I* — intermediare (reacție intermediară).

pe baza ultrastructurii benzii M (vezi tabelul 8.IX), ușor de surprins chiar la o simplă examinare a imaginilor electronomicroscopice.

Tabelul 8.IX prezintă comparativ caracteristicile fibrelor musculare scheletice roșii și albe. Fibrele intermediare au caracteristici intermediare între cele două extreme prezentate în tabelul 8.IX și tabelul 8.X, dar sînt mai degrabă asemănătoare celor roșii decît celor albe.

TABELUL 8.IX

Comparație între fibrele musculare scheletice roșii și albe

	Fibre roșii (lente)	Fibre albe (rapide)
1	2	3
Caracteristici funcționale — contracția — rezistența la oboseală — datorie de oxigen	de tip tonic obosesc greu nesemnificativă	de tip fazic obosesc ușor importantă
Distribuție — preponderent în	mușchii posturali	mușchi ai membrelor
Vascularizație — densitatea de capilare sanguine în jurul fibrei	mai mare	mai mică
Caracteristici dimensionale — grosimea fibrei — raportul suprafață/volum	mai mică mai mare	mai mare mai mic
Substratul contractil Miofibrilele — volumul ocupat din volumul total al fibrei — banda Z — banda M Proteine contractile	mai mic este de două ori mai raport cu fibra albă 5 substriații majore	mai mare groasă în fibra roșie în 3 substriații majore

Scanned with OKEN Scanner

Continuare tabelul 8. IX

1	2	3
Miozina		
— alcătuire polipeptidică	lanțurile ușoare diferă ca număr și greutate moleculară	
— activitate ATP-azică	puțin intensă	foarte intensă
Actina, tropomiozina, troponina	similare	
Aparatul metabolic		
Combustibil stocat	grăsimi	glicogen
Principala sursă de ATP	oxidarea acizilor graşi (fosforilare oxidativă)	glicoliza anaerobă
Mitocondrii		
— număr	mai multe	mai puține
— localizare	mai frecvent (superficial (subsarcolemal)	mai frecvent intermiofibrilar, banda I
— număr de criste	mai mare	mai mic
Profil enzimatic		
— enzime oxidative ex. succinatdehidrogenaza	+++	+
— fosforilaza	+	+++
Mioglobina	multă	puțină
Cuplarea excitație-contracție		
Sistemul T	mai puțin dezvoltat	mai dezvoltat (dublu ca volum față de fibrele roșii)
Reticulul sarcoplasmic		
— dezvoltare generală	moderată	extensivă
— volum ocupat de cisterne terminale	dublu în fibrele albe față de fibrele roșii	
— volum ocupat de reticulul sarcoplasmic nejoncțional	aproximativ egal	
— număr de particule intramembranare (pompe de Ca)	mai mic	mai mare
Inervație		
Joncțiunea neuromusculară		
Butonul terminal		
— dimensiuni	mai mic	mai mare
— formă	elipsoidal	turtit, alungit
— vezicule sinaptice	mai puține	mai numeroase
Invaginările membranei postsinaptice (sarcolema)		
— dimensiuni	relativ scurte	adînci
— spațiere	distanțate unele de altele	unele lîngă altele

8.2.1.3.1. Fibrele musculare roșii

Fibrele musculare roșii (fig. 8.47) sînt adaptate pentru utilizare continuă. Ele sînt bogat vascularizate și au un raport suprafață/volum relativ mare, ceea ce le permite schimburi mai intense cu spațiul extracelular. Fibrele roșii au numeroase mitocondrii și de aceea sursa principală de energie este oxidarea mitocondrială a acizilor graşi, mai eficientă energetic decît glicoliza anaerobă extramitocondrială. Sistemul T și reticulul sarcoplasmic joncțional (cisternele terminale), care sînt substratul morfologic al cuplării exci-

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 8. X

Volumul procentual ocupat de diferite componente celulare în fibrele musculare roşii şi albe din muşchiul cvadriceps la om (după B. R. Eisenberg, 1983)

Componenta celulară	fibre roşii (lente)	fibre albe (rapide)
Mitocondrii	3,03	1,14
Sistemul T	0,13	0,28
Reticulul sarcoplasmic		
— total	1,22	1,94
— cisterne terminale	0,67	1,20
— nejoncțional (liber)	0,55	0,74
Granule lipidice	0,47	0,18

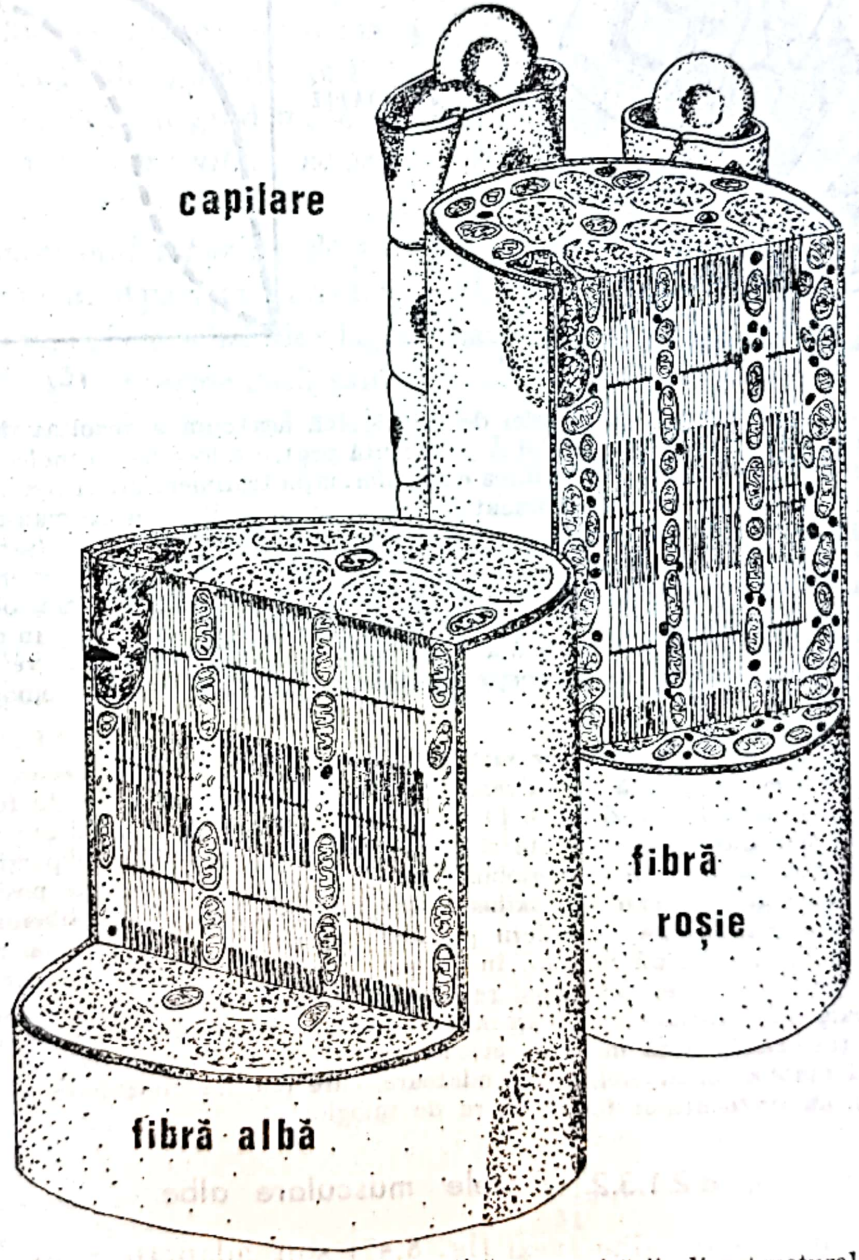


Fig. 8. 47. — Reprezentare schematică a organizării ultrastructurale a unei fibre musculare scheletice albe şi a unei fibre musculare scheletice roşii (pentru explicaţii detaliate vezi tabelul 8.IX).

Scanned with OKEN Scanner

taţie-contracţie, sînt mai puţin dezvoltate şi datorită acestui fapt fibrele roşii răspund mai lent la excitaţii. Culoarea roşie se datoreşte în principal unui conţinut mai mare de mioglobină în sarcoplasmă.

Mioglobina este o proteină asemănătoare unei subunităţi din hemoglobină, cu care este „rudă" structurală şi funcţională. Extrasă din muşchi, purificată şi cristalizată de Theorell în 1934, este prima proteină a cărei structură tridimensională (terţiară) a fost clarificată folosindu-se difracţia cu raze X (J. C. Kendrew, 1960; premiul Nobel pentru chimie în anul 1963). Mioglobina este o proteină globulară cu greutatea moleculară 16 800, la care este coordinat un grup prostetic hem, identic cu cel din hemoglobină (vezi fig. 8.48 A).

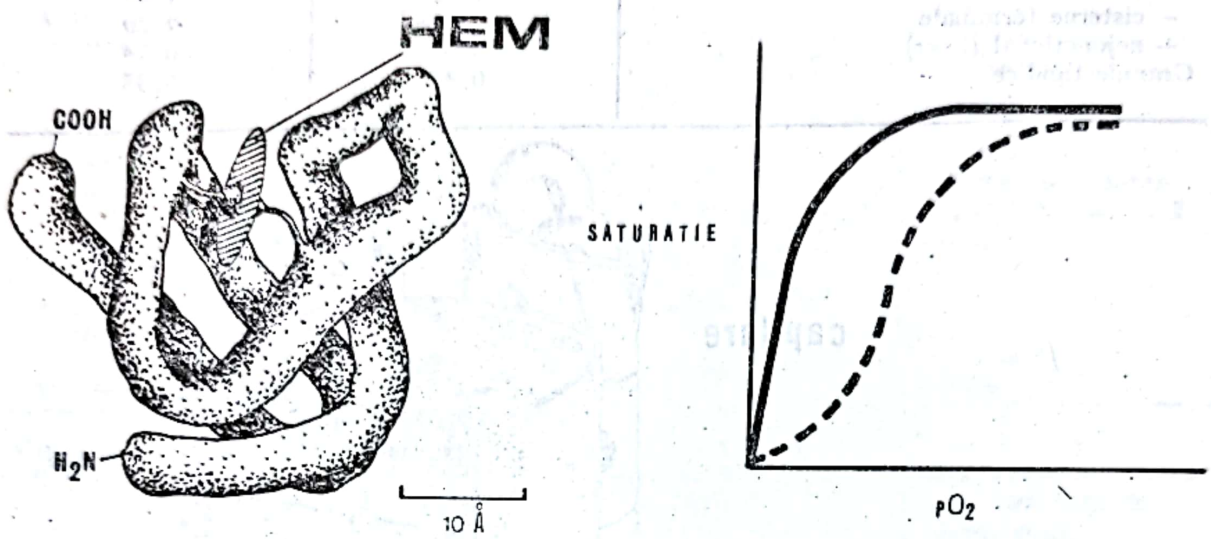


Fig. 8.48. — A — Conformaţia moleculei de mioglobină aşa cum a rezultat din studiile de difracţie cu raze X, cu o rezoluţie de 1,4 Å, suficientă pentru a localiza în moleculă practic fiecare dintre cei 2 500 de atomi din alcătuirea ei. Conformaţia tridimensională (terţiară) torsionată a moleculei de mioglobină nu este accidentală ci corespunde situaţiei de maximă stabilitate; *B* — comparaţie între curba de disociere a oximioglobinei şi oxihemoglobinei (saturaţia % cu O_2 funcţie de presiunea parţială a O_2 — pO_2). Se remarcă faptul că, curba de disociere a oximioglobinei are forma unei hiperbole rectangulare şi nu sigmoidală, ca în cazul oxihemoglobinei. De aceea mioglobina se poate combina cu O_2 la presiuni parţiale mult mai mici decît în cazul hemoglobinei; de precizat că la presiunea parţială a O_2 de circa 40 mmHg din sîngele venos mioglobina se poate satura cu O_2 în proporţie de 95%; — mioglobina; - - - hemoglobina.

Mioglobina constituie un rezervor sarcoplasmic temporar de oxigen deoarece mioglobina, ca şi hemoglobina, este capabilă de oxigenare şi deoxigenare reversibilă, în funcţie de presiunea parţială a oxigenului (vezi fig. 8.49 B). Dar mioglobina are o afinitate pentru oxigen mai mare decît hemoglobina ! Se poate combina cu oxigenul la presiuni parţiale ale oxigenului mult mai mici ca în cazul hemoglobinei şi corolarul acestui fapt este posibilitatea mioglobinei de a „extrage" oxigenul din oxihemoglobină. Pe de altă parte, eliberarea oxigenului din oximioglobină, ca urmare a scăderii presiunii lui parţiale, decurge mai rapid decît în cazul oxihemoglobinei. Într-un muşchi, în timpul contracţiei, din motive mecanice, debitul sanguin scade, pentru a reveni în cursul relaxării. Prezenţa mioglobinei permite depozitarea temporară a oxigenului intracelular, oxigen care poate fi folosit în condiţiile ischemice din timpul contracţiei. Importanţa mioglobinei ca rezervor intracelular de oxigen este atestată şi de faptul că muşchii mamiferelor scufundătoare, care pot sta mult timp sub apă (foca, morsa, balena), au un conţinut foarte mare de mioglobină.

8.2.1.3.2. Fibrele musculare albe

Fibrele musculare albe (vezi fig. 8.47) sînt adaptate pentru contracţii rapide, de scurtă durată. Ele sînt mai groase şi au mai puţin acces la capilarele sanguine, au mai puţine mitocondrii şi mai puţină mioglobină. Principala

Scanned with OKEN Scanner

lor cale de obținere a ATP-ului este glicoliza și, din cauza relativei inefici-ențe energetice a glicolizei anaerobe, ele pot susține contracția numai pentru perioade scurte de timp, obosind ușor. Perioadele de repaus sînt necesare pentru îndepărtarea sau metabolizarea acidului lactic format și pentru a obține din nou glucoză. Fibrele albe au un sistem T și un reticul sarcoplasmic mai bine dezvoltate decît cele roșii, ceea ce explică rapiditatea mai mare cu care ele răspund la excitații.

Distribuția fibrelor musculare albe, intermediare și roșii în mușchii scheletici la om. În organismul uman mușchii scheletici sînt, de cele mai multe ori, alcătuiți dintr-un amestec în proporții variate, al celor trei tipuri de fibre (tabelul 8.XI). La om, nu există mușchi pur roșii sau pur albi. Mușchii scheletici ai persoanelor sedentare conțin mai puțin fibre albe decît roșii. Alergătorii de distanțe lungi (dar nu halterofilii!) au mai multe fibre albe (Prince și colab., 1981). Deci există un grad mare de adaptabilitate la solicitări. Este unanim acceptat faptul că *o unitate motorie conține un singur tip de fibre musculare scheletice.*

Determinismul tipurilor de fibre musculare scheletice și plasticitatea lor morfofuncțională. Apariția caracteristicilor de „roșu" sau „alb" se produce în fibrele musculare scheletice la om înainte de naștere, dar tipul de fibră musculară (roșie, intermediară sau albă) nu este un dat definitiv, așa cum s-a crezut pînă prin 1970. Experimente elegante de inervație încrucișată, inițiate în anii '60 de J. C. Eccles (premiul Nobel pentru medicină în 1963), au arătat că *influențele nervoase sînt decisive*: un nerv al unui mușchi roșu „pus" să inerveze un mușchi alb, transformă fibrele acestuia în fibre roșii și vice-versa. Deocamdată nu se cunoaște mecanismul prin care un neuron poate determina o fibră musculară să devină roșie și un alt neuron o poate influența să devină albă. Cea mai directă explicație ar fi existența unor *factori neurotrofici specifici* (?).

TABELUL 8. IX

Distribuția tipurilor de fibre musculare în unii mușchi scheletici umani
(după Schmalbruch, 1970)

Mușchiul	Tipuri de fibre (în procente)		
	Roșii	Intermediare	Albe
M. deltoides	34	30	36
M. triceps brachii, cap. lat.	49±5	1±1	50±5
M. brachialis	27±6	36±10	37±5
M. biceps brachii cap. long.	32±3	25±3	43±3
M. trapezius	50	0	50
Mc. rectus abdominis	41±2	0	59±2
Diaphragma	31	27	42
M. gastrocnemius cap. lat.	8±5	82±4	10±5
M. soleus	7±4	89±4	4±3
M. tensor fast. lat.	0	57	43

Scanned with OKEN Scanner

8.2.1.4 Histogeneza fibrelor musculare scheletice

Mușchii scheletici se formează din mezodermul embrionar, din somite, în care există grupuri determinate de celule alcătuind miotoame. Celulele din aceste miotoame sînt premioblaste (Warren, 1975), celule precursoare ale mioblastelor (fig. 8.49).

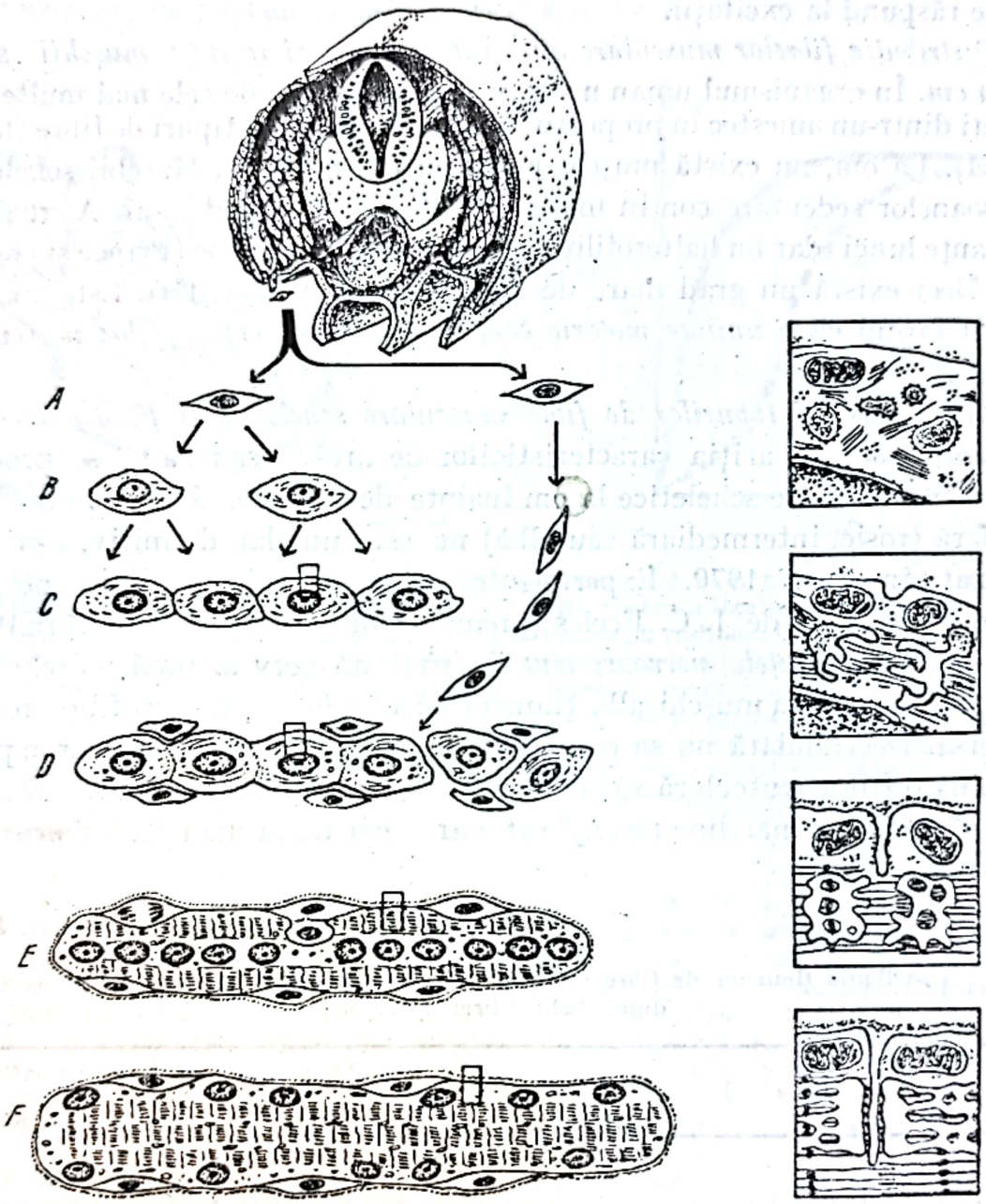


Fig. 8. 49. — Histogeneza fibrelor musculare scheletale: *A* — premioblaști; *B* — mioblaști; *C* — alăturarea mioblaștilor; *D* — fuziunea mioblaștilor; *E* — formarea miotubului; *F* — fibră musculară striată.

Mioblastele sînt celule mononucleate, cu caracteristici de celule tinere: nucleu mare, nucleoli proeminenți și citoplasmă bogată în ribozomi. Mioblastele nu conțin însă miofibrile organizate și nu prezintă tubi T. Mai multe

Scanned with OKEN Scanner

mioblaste fuzionează și se formează un *miotub*, precursorul imediat al fibrei musculare scheletice propriu-zise, care este de natură sincițială. În această formațiune sincițială, nucleii sînt încă situați central, apar miofibrilele de tip adult și tubii T. Diferențierea definitivă a fibrei musculare scheletice se face prin migrarea nucleilor la periferie, desăvîrșirea miofibrilelor și realizarea configurației sistemului sarcotubular.

Creșterea fibrelor musculare scheletice. Creșterea numărului de fibre musculare din mușchii scheletici se sistează intrauterin (exemplu: pentru mușchiul sartorius creșterea numărului de fibre musculare se stopează la fătul uman cînd acesta atinge lungimea de 13—17 cm). Creșterea ulterioară în volum a mușchilor se face numai pe seama creșterii dimensiunilor fibrelor musculare preexistente. Nucleii fibrelor musculare scheletice adulte, diferențiate, sînt rămași în faza G_1 a ciclului celular; ei nu mai sintetizează niciodată ADN (nu intră în faza S a ciclului celular) și nu se mai divid. Nuclei în plus, în fibra musculară scheletică, apar numai prin fuziune celulară, probabil cu celule satelite.

Creșterea miofibrilelor. Creșterea *în grosime* se face prin adăugarea laterală de miofilamente, dar pînă la o anumită limită, peste care probabil că ele nu mai pot funcționa eficient. Odată atinsă această limită, miofibrilele se scindează longitudinal și cresc ca număr. Creșterea *în lungime* nu se datorește sporirii lungimii sarcomerelor [după Goldspink (1973) în cursul histogenezei sarcomerele se măresc cu cel mult 25% din lungimea inițială]. De aceea, creșterea în lungime trebuie să aibă la bază *adăugarea de noi sarcomere*. Datele disponibile actualmente sugerează că sarcomerele nou-formate nu sînt inserate la întîmplare de-a lungul miofibrilei, ci (numai) la capetele miofibrilelor, în vecinătatea joncțiunii dintre fibra musculară scheletică și tendon.

8.2.1.5. Regenerarea fibrelor musculare scheletice

Fibrele musculare scheletice fiind celule foarte diferențiate, nu se divid. Totuși, la o scară mică, procesul de regenerare poate fi realizat de *celulele-satelite*, care sînt progenitori reziduali ai fibrelor musculare scheletice, rămași în strînsă asociere cu ele. Celulele-satelite sînt slab diferențiate și capabile de diviziune.

Celulele-satelite

Celulele-satelite au fost descoperite la microscopul electronic de Mauro, în 1961, și pot fi identificate numai prin microscopie electronică.

Definiție. Celulele-satelite sînt celule mononucleate, nediferențiate structural, cu rol primordial în creșterea și regenerarea mușchiului scheletic.

Localizare. Celulele-satelite se găsesc în toți mușchii scheletici de vertebrate, inclusiv în fusurile neuromusculare. Prezența lor în mușchiul cardiac sau neted nu a fost demonstrată și foarte probabil ele lipsesc în aceste varietăți de țesut muscular. Celulele-satelite sînt situate într-un spațiu (depresiune) limitat, pe de o parte, de sarcolema fibrei musculare striate și, pe de alta, de membrana bazală. De jur împrejurul celulei-satelite există un spațiu electronotransparent de cca 15—20 nm. Celulele-satelite sînt repartizate (relativ) uniform de-a lungul fibrei musculare scheletice.

Formă, dimensiuni, orientare. Celulele-satelite sînt fuziforme, dimensiunile lor obișnuite fiind 25 × 4 × 5 μm, cu axul mare orientat paralel cu axul fibrelor musculare scheletice.

Scanned with OKEN Scanner

Număr. Determinarea exactă a numărului de celule-satelite este încă sever limitată de probleme pur tehnice (exemplu: la microscopul optic nucleii celulelor-satelite apar perfect aliniați mionucleilor). Dificultatea numărării directe a celulelor-satelite, care nu pot fi recunoscute neechivoc decît prin microscopie electronică, rezultă clar din următorul exemplu oferit de Cullen și Mastaglia (1980). Pentru examinarea completă a 1 000 de fibre musculare striate la mărirea de 25 000 × la microscopul electronic, ar fi necesară efectuarea a 50 000 de microfotografii electronice (!) și încă 5—10 ani pentru a le putea examina (!!).

În practică, se adoptă formula Schultz (1974) pentru a calcula numărul de celule-satelite asociate unei fibre musculare scheletice:

$$n = P \times L/d$$

unde:

n = numărul de celule satelite

L = lungimea mușchiului în mm

P = procentul de fibre acompaniate de o celulă-satelită pe secțiune transversală

d = lungimea medie a unui nucleu în μm.

În general, numărul de celule-satelite este de 1—2/mm de lungime a fibrei musculare scheletice, ceea ce ar corespunde la 500 000—1 milion celule-satelite/g de mușchi.

TABELUL 8. XII

Numărul de celule-satelite în mușchiul scheletic normal și patologic la om
(după Ishimoto și colab., 1983)

	Nr. de celule-satelite (procentul din numărul de mionuclei)
Copil normal	8,1
Adult normal	4,3
Distrofie musculară Duchenne	28,1
Polimiozită	14,9

Factori care influențează numărul de celule-satelite

a) Tipul de fibră musculară: în general numărul de celule-satelite este de cca trei ori mai mare pentru fibrele lente (roșii) față de cele rapide, ceea ce sugerează un determinism neurogen al raportului celule-satelite/fibră musculară striată.

b) Vîrsta: la naștere se apreciază că numărul de celule-satelite reprezintă 30—35% din numărul mionucleilor, dar numărul celulelor-satelite scade rapid la jumătate în primele săptămîni de viață extrauterină (tabelul 8.XII); tiroxina încetinește scăderea postnatală a numărului celulelor-satelite; la adult numărul lor reprezintă 4—5% din numărul mionucleilor și această proporție persistă toată viața.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Stări patologice* (vezi tabelul 8. XII).

Originea: există în momentul de față trei ipoteze propuse pentru a explica originea și persistența celulelor-satelite.

1. Celulele-satelite sînt premioblaști embrionari a căror dezvoltare a fost stopată în cursul miogenezei, ca urmare a unor semnale necunoscute încă (exemplu: particularități de compoziție moleculară a matricei extracelulare și/sau a membranei bazale, neurotransmițători, factori difuzibili etc.).

2. Celulele-satelite aparțin unei subclase speciale din linia miogenică, avînd un precursor comun cu mioblaștii embrionari.

3. Celulele-satelite s-ar forma prin „dediferențierea" mionucleilor, care s-ar separa din fibra musculară scheletică parentală printr-un proces de segregare membranară.

Datele actuale nu permit tranșarea formală în favoarea vreuneia dintre cele trei ipoteze menționate.

Structura și ultrastructura celulei-satelite „în repaus". Celulele-satelite din mușchii scheletici ai adultului sînt considerate inactive, liniștite sau în repaus.

Nucleul este oval, cu dimensiunile de 10—15 × 2—5 × 1—3 μm și este net heterocromatic. Prin comparație, mionucleii fibrelor musculare striate sînt mai mici și eucromatici, deci mai activi. Raportul nucleocitoplasmatic al celulei-satelite este foarte mare.

Citoplasma este cantitativ puțină. Distribuția și cantitatea organitelor nu arată specializări de tip fagocitar sau secretor. În citoplasmă pot fi observate cîteva mitocondrii mici, o zonă Golgi și un reticul endoplasmatic puțin dezvoltate și rari lizozomi. Nu există granule de glicogen și, prin definiție, citoplasma celulei-satelite nu conține miofilamente.

Membrana nu stabilește nici un fel de conexiuni structurale (joncțiuni) cu sarcolema fibrei musculare scheletice.

Structura și ultrastructura celulei-satelite „active". Celulele-satelite sînt considerate active în perioada perinatală. La adult celulele-satelite active apar *numai* în mușchii traumatizați sau în anumite stări patologice. Transformarea din celulă-satelită liniștită în celulă activă are loc în 24—48 ore și este tranzitorie, reîntoarcerea la starea inactivă avînd loc după circa 3 zile.

Morfologic, celula-satelită activă este asemănătoare calitativ premioblaștilor embrionari. Celulele active sînt mai mari, au expansiuni citoplasmice, iar spațiul clar pericelular este mai larg (cca 60 nm). Nucleul și citoplasma prezintă semne de activare: cromatina este dispersată, există numeroși ribozomi liberi, ca și un reticul endoplasmic rugos și un complex Golgi bine dezvoltat. În celulele-satelite activate se observă numeroși microtubuli.

În general, se admite că celulele-satelite pot funcționa ca resurse pentru repararea fibrelor musculare scheletice lezate (fig. 8.50) sau chiar pentru formarea de noi fibre musculare. În urma unei leziuni, celulele-satelite, care în mod normal sînt „liniștite", se activează, proliferează și apoi fuzionează reparînd fibra musculară scheletică sau formînd o altă fibră *de novo*. Totuși formarea de fibre musculare noi, datorită transformării celulelor-satelite în mioblaste și fuzionării acestora cu formare de fibre noi, *nu este* suficientă pentru a compensa distrugerile de fibre musculare în cazul unor traumatisme musculare masive. De regulă, țesutul muscular scheletic distrus (masiv) este înlo-

Scanned with OKEN Scanner

cuit de țesut conjunctiv cicatriceal. În concluzie, *țesutul muscular scheletic are o capacitate de regenerare (foarte) limitată*. Legătura cu fibra nervoasă motorie este esențială pentru realizarea regenerării fibrei musculare scheletice.

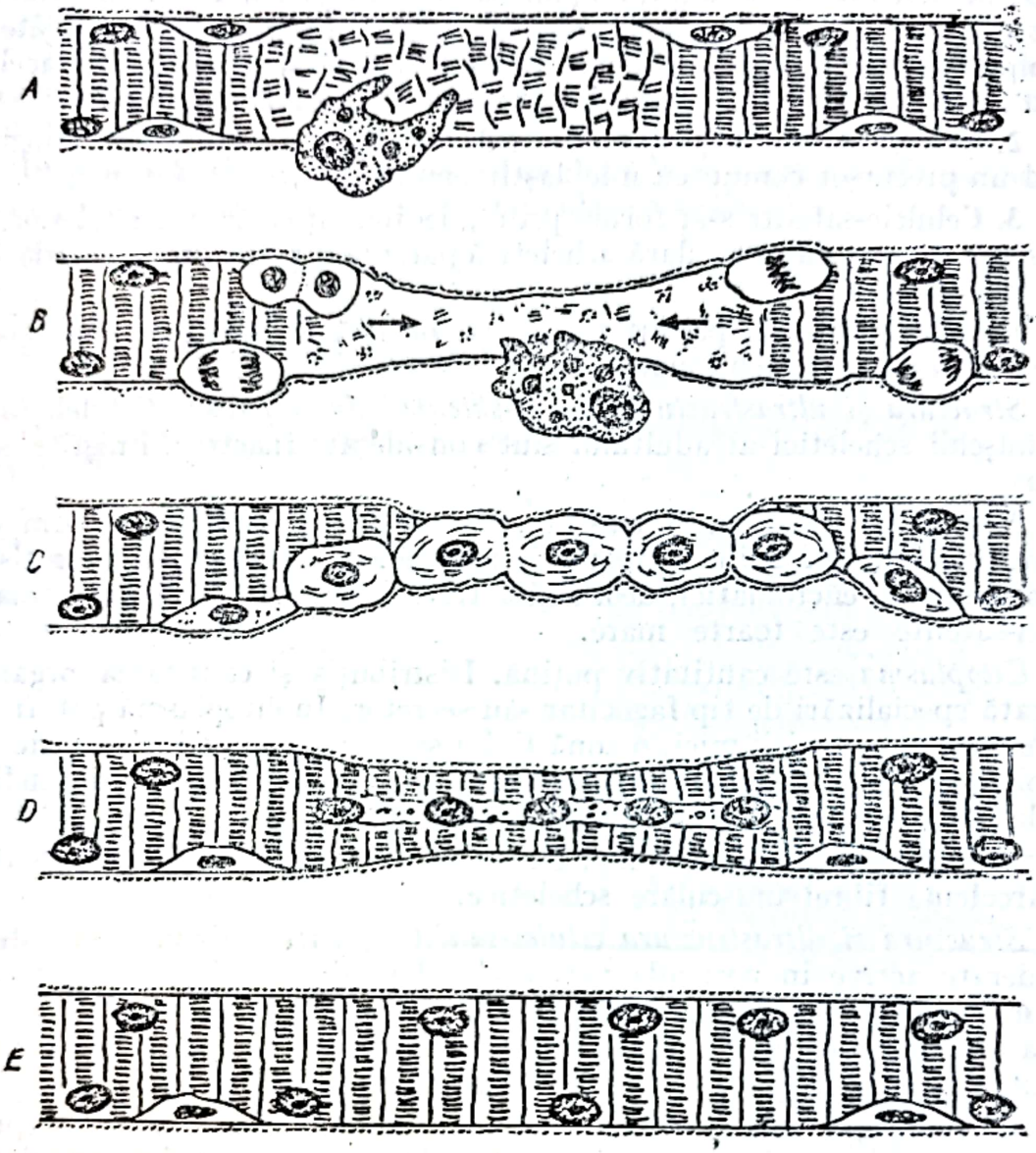


Fig. 8. 50. — Regenerarea fibrelor musculare striate scheletice, în urma unei leziuni:
A — fibră musculară scheletică lezată, cu intervenția unui macrofag; *B* — după intervenția macrofagului celulele-satelite încep să se dividă mitotic; *C* — celulele-satelite ocupă porțiunea din fibră care a fost lezată; *D* — prin fuziunea celulelor-satelite între ele și cu fibra musculară striată lezată anterior se reface complet *(E)* fibra musculară.

Consecințe practice pentru traumatologia mușchiului scheletic

În traumatologie, conduita terapeutică este ghidată de ideea de la sfîrșitul secolului trecut (Volkmann, 1893), și anume că mușchiul striat este incapabil de regenerare eficientă, fiind un țesut înalt diferențiat. De aceea, atitudinea generală în fața unui mușchi traumatizat este: *a*) debridarea largă; *b*) zona de excizie să treacă prin țesut sănătos și *c*) regiunea traumatizată trebuie imobilizată pînă la cicatrizare și apoi mobilizată cu prudență. Motiva-

Scanned with OKEN Scanner

ția este dublă; pe de o parte, țesutul necrotic este un mediu de cultură pentru germeni anaerobi și excizia limitată riscă infecție, iar pe de altă parte, excizia largă evită formarea excesivă de țesut cicatriceal care ar determina retracția fibroasă, deci compromiterea funcției.

Pe baza cunoștințelor actuale asupra regenerării musculare se pot formula cîteva principii vizînd optimizarea potențialului regenerativ (Plaghki, 1985):

— Mușchiul striat se regenerează pornind de la celulele mioblastice (satelite) supraviețuitoare în mușchiul traumatizat, pe cale de degenerare. De aceea debridarea largă a mușchiului aparent necrotic, reduce cantitativ singura sursă realmente importantă de celule miogene! În consecință, *este esențial să se facă tot posibilul pentru conservarea maximă de țesut muscular necrotic*!! (bineînțeles în condițiile luptei adecvate împotriva infecției).

— Fazele inițiale de proliferare și de fuziune mioblastică progresează satisfăcător numai dacă membranele bazale ale fibrelor musculare vechi sînt prezente. De aceea, *repararea minuțioasă a armăturii conjunctive*, inclusiv a fasciilor, este importantă.

— *Aportul vascular adecvat* este esențial, deoarece disocierea spațio-temporală a populației mioblastice de rețeaua vasculară este factor limitativ al regenerării. Tehnici de microanastomază vasculară au condus deja la rezultate încurajatoare.

— *Inervația adecvată* este și ea importantă pentru maturarea și menținerea integrității morfofuncționale a fibrelor musculare regenerate. Dacă microanastomozele nervoase nu sînt posibile, atunci devine necesară implantarea extremității unui nerv motor ln masa musculară. Viteza de regenerare a axonilor unui nerv motor este de 1,5 mm/zi în mușchi.

— *Tensiunea pasivă* în axul mecanic al mușchiului *favorizează* procesul de regenerare și este *indispensabilă* pentru stimularea morfogenezei armăturii conjunctive.

— *Mobilizarea activă precoce* stimulează capacitatea funcțională a fibrelor regenerate.

8.2.1.6. Joncțiunea dintre fibrele musculare scheletice și tendon

Forța produsă de mușchii scheletici este transmisă oaselor prin intermediul joncțiunii mușchi-tendon, tendonul fiind, prin definiție, inextensibil. La locul de contact între mușchi și tendon, țesutul conjunctiv din endo-, peri- și epimisiu devine fibros și se continuă cu tendonul. În interiorul fibrelor musculare, filamentele subțiri de actină se ancorează de sarcolemă și astfel contracția miofibrilelor este trecută sarcolemei cu membrana bazală și apoi tendonului, fibrilele colagene din lama reticulară continuîndu-se cu fibrilele de colagen din tendon.

Ultrastructură. La extremitatea fibrei musculare scheletice către tendon fibra se subțiază treptat (fig. 8.51) și sarcolema prezintă un mare număr de invaginații în deget de mănușă. Astfel, suprafața de contact fibră musculară-tendon este crescută de 20—30 de ori față de un contact plat (Eisenberg și Milton, 1984; Tidball, 1984), ceea ce asigură o ancorare mai bună a zonei prin care forța este transmisă tendonului.

Scanned with OKEN Scanner

Analize precise morfometrice (tabelul 8.XIII) au arătat că volumul ocupat de miofibrile, sistemul T și cisternele terminale la capătul fibrei musculare scheletice dinspre tendon (ultimii 100 μm) este același ca în orice altă porțiune a fibrei musculare scheletice. Dar, există trei deosebiri:

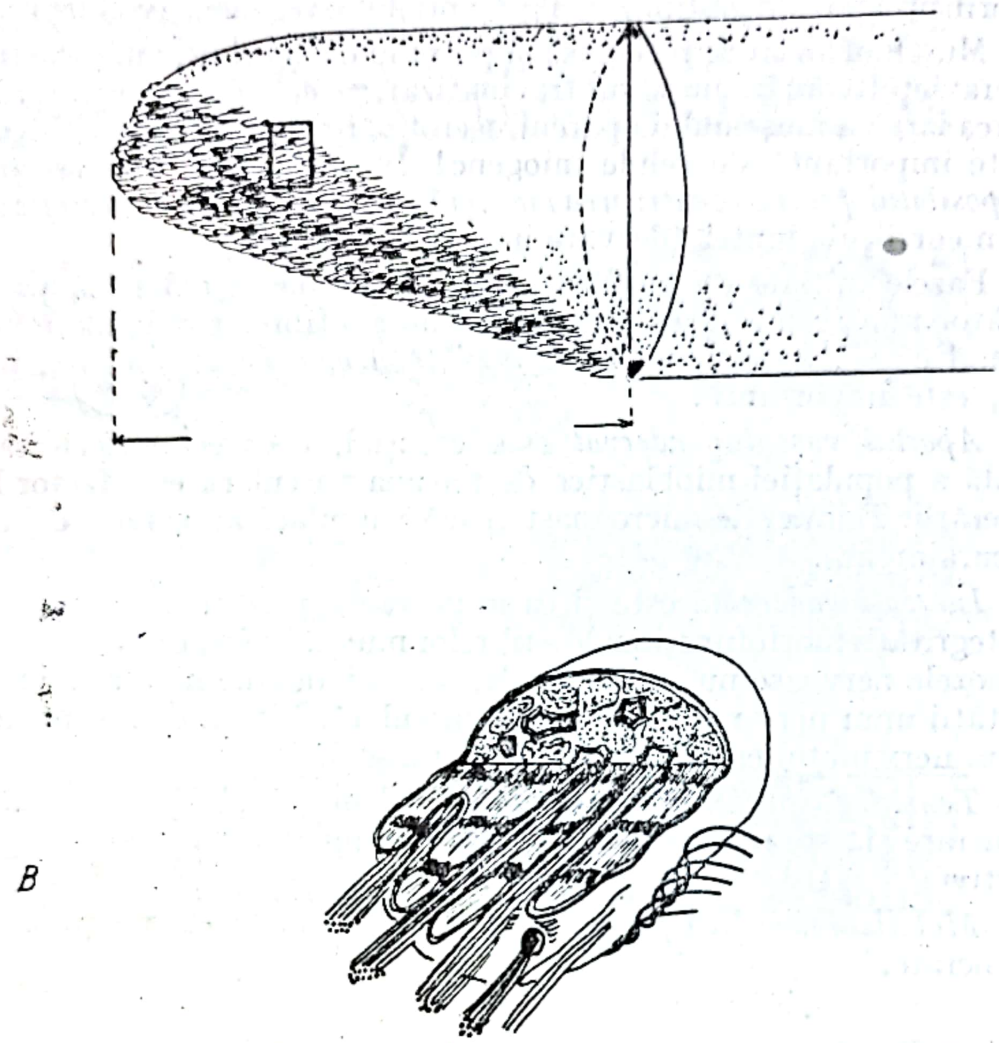


Fig. 8. 51. — Schema porțiunii terminale a fibrei musculare scheletice la joncțiunea ei cu tendonul : *A* — se remarcă subțierea progresivă a fibrei musculare spre capătul ei dinspre tendon, precum și faptul că sarcolema prezintă numeroase digitații viliforme; *B* — detaliu de organizare ultrastructurală a porțiunii încadrate în chenar din fig. 8. 51 A. Se remarcă pătrunderea fibrilelor de colagen printre digitațiile viliforme ale sarcolemei, ceea ce asigură o solidaritate mecanică puternică a joncțiunii mio-tendinoase.

a) sarcomerul terminal este mai scurt: are lungime medie 2,3 +0,1 μm față de celelalte sarcomere, a căror lungime medie este de 2,6+0,1 μm;

b) volumul ocupat de mitocondrii este mai mare, dublu sau chiar triplu, și implică o supraproducție locală de ATP; nu se cunoaște semnificația funcțională a acestei necesități suplimentare de ATP în vecinătatea joncțiunii miotendinoase;

c) volumul reticulului sarcoplasmic longitudinal este mai mic cu cca 35% decît oriunde de-a lungul fibrei; deocamdată, nu se cunoaște semnificația funcțională a acestei diferențe.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 8.XIII

Ultrastructura fibrei musculare scheletice în vecinătatea joncțiunii mio-tendinoase*

Componenta celulară	Volumul relativ (procente) ocupat de diferite componente în fibra musculară scheletică	
	În porțiunea mijlocie a fibrei	În porțiunea terminală a fibrei (ultimii 100 μ,m)
Miofibrile	83±2	80±3
Mitocondrii	1,6±0,1	6 ±2,3**
Sistemul T	0,32±0,02	0,30±0,01
Reticul sarcoplasmic		
— cisterne terminale	4,1±0,4	3,6±0,5
— reticul sarcoplasmic longitudinal	5 ±0,3	3,7±1***

* Mușchi sartorius de broască (după Eisenberg și Milton, 1984).
** $p < 0,05$.
*** $p < 0,1$.
Gradele de semnificație determinate prin testul Fischer-Behren.

8.2.1.7. Inervația motorie a fibrelor musculare scheletice

8.2.1.7.1. Unitatea motorie

Neuronul motor împreună cu fibrele musculare pe care le inervează formează o unitatea motorie (fig. 8.52). Numărul fibrelor musculare scheletice inervate de un singur neuron variază în funcție de tipul de mușchi. În general, cu cît mișcările sînt mai fine, cu atît numărul fibrelor musculare inervate de un neuron motor este mai mic, și invers. Spre exemplu, în mușchii extrinseci ai globilor oculari fiecare fibră musculară este inervată de un axon (unitate motorie mică), dar în mușchii majori ai membrelor, un singur axon inervează 1 500—2 000 de fibre musculare (unitate motorie mare). Interdependența neuron-fibră musculară scheletică în cadrul unității motorii, este demonstrată neechivoc prin secționarea axonului, ceea ce determină atrofia fibrelor musculare dependente de el (atrofie de denervare).

8.2.1.7.2. Placa motorie (placa terminală sau joncțiunea mio-neurală)

Aceasta este un exemplu tipic de sinapsă neuro-efector, sinapsă chimică, excitatorie, colinergică (vezi țesutul nervos: sinapsa) (vezi fig. 8.52 și fig. 8.53). Pe măsură ce axonul se apropie de fibrele musculare, ramificațiile sale își pierd teaca de mielină, dar rămîn acoperite de o continuare a celulelor Schwann și se termină cu „butoni", așezați într-o depresiune pe suprafața fibrei musculare scheletice, numită *depresiune sinaptică* (jgheab sinaptic) sau *fantă sinaptică primară*.

Porțiunea presinaptică. Butonul terminal are o ultrastructură tipică pentru o presinapsă (vezi fig. 8.52), conținînd numeroase mitocondrii (care ocupă 13—17% din volumul butonului terminal) și cîteva sute de mii de *vezicule sinaptice* (cca 1 000/μm^3), cu diametrul de 40—50 nm, în care este stocată acetilcolina, mediatorul chimic al plăcii motorii. Prezența veziculelor

Scanned with OKEN Scanner

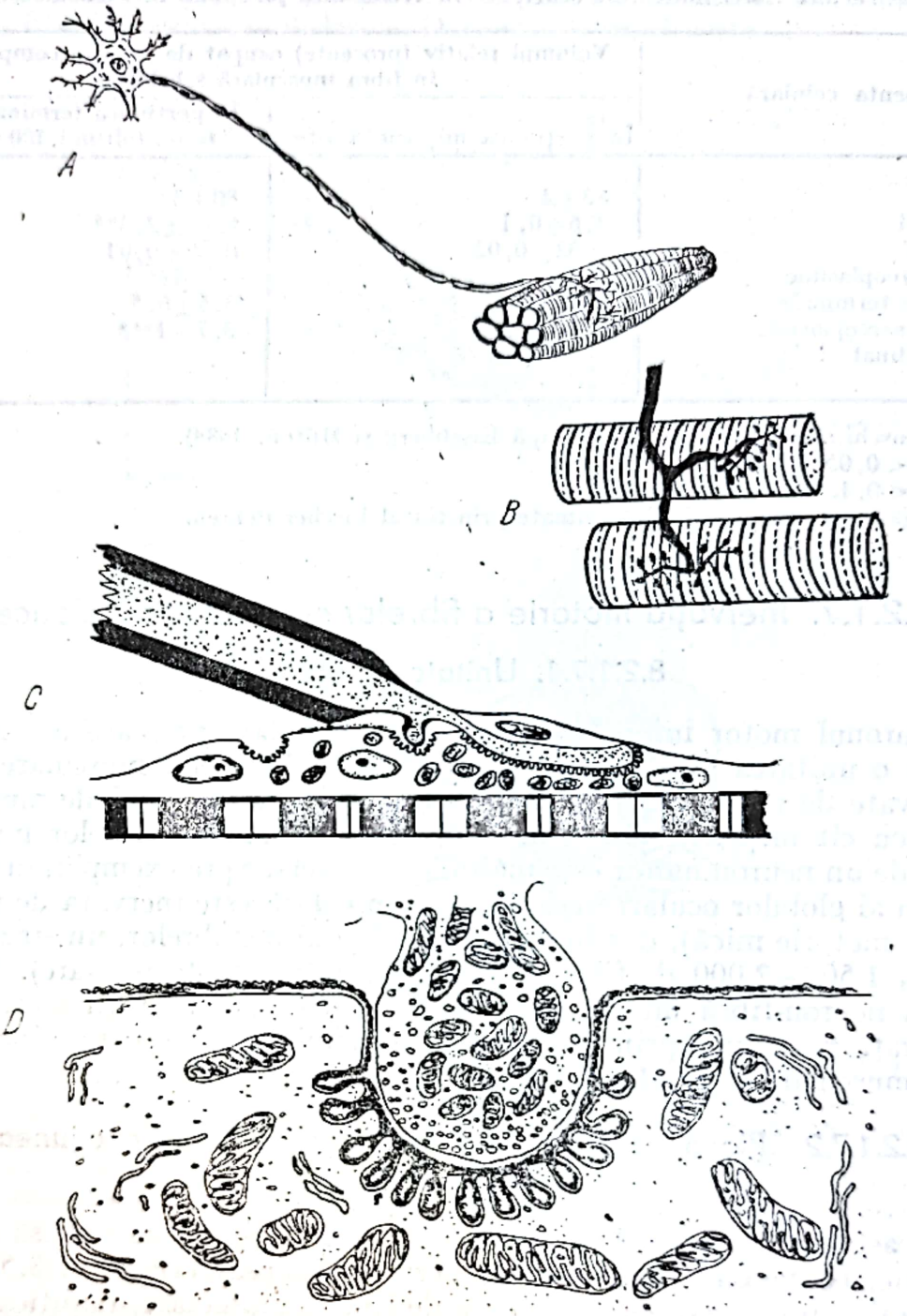


Fig. 8. 52. — Reprezentarea schematică a inervației motorii a fibrelor musculare scheletice:
A — unitatea motorie; *B* — aspectul plăcilor motorii la microscopul optic (compară cu fig. 8.53); *C* — aspectul electronomicroscopic al plăcii motorii la putere măritoare mică; *D* — aspectul electronomicroscopic al plăcii motorii la putere măritoare mare: se remarcă prezența veziculelor sinaptice și a mitocondriilor în butonul terminal al axonului, precum și falduraţiile membranei postsinaptice.

Scanned with OKEN Scanner

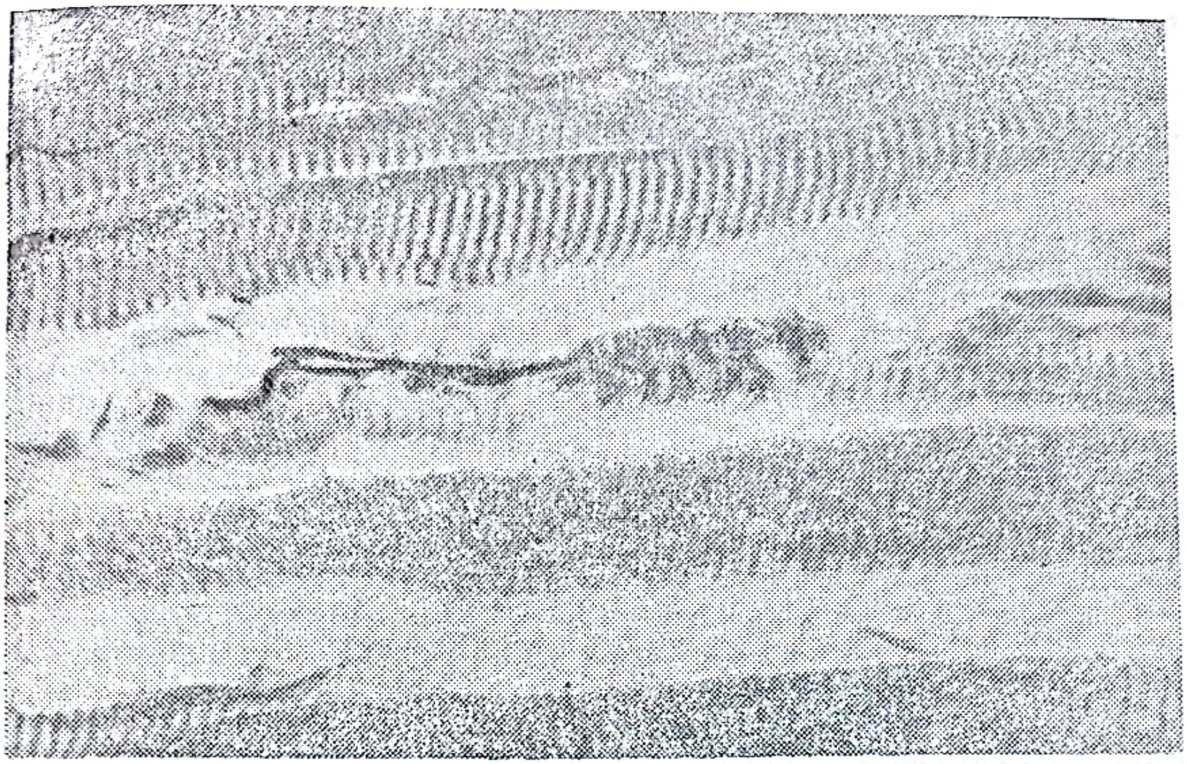


Fig. 8. 53. — Imagine de microscopie optică a unei plăci motorii, pusă în evidență prin impregnare argentică (din colecția prof. I. Diculescu).

sinaptice numai în presinapsă asigură asimetria morfologică a plăcii motorii, care stă la baza transmiterii impulsului nervos unidirecțional și ireciproc (numai de la pre- la postsinapsă). Membrana presinaptică este în ultimă instanță un traductor electrochimic care convertește semnalul electric (potențialul de acțiune propagat) într-un semnal chimic, eliberarea cuantelor de acetilcolină în fanta sinaptică. O cuantă de acetilcolină corespunde la 12 000—20 000 de molecule de acetilcolină, număr de molecule ce pot fi ușor împachetate într-o veziculă sinaptică.

Porțiunea postsinaptică este caracterizată printr-o contiguratie specială ultrastructurală și o compoziție moleculară particulară a sarcolemei, care formează membrana postsinaptică (subsinaptică). De asemenea, sarcoplasma imediat adiacentă conține numeroși nuclei „veziculoși", mai multe mitocondrii și aglomerări locale de ribozomi și reticul endoplasmic rugos (vezi fig. 8.52).

Membrana subsinaptică — microdomeniu special al sarcolemei. Electronomicroscopic, sarcolema subsinaptică prezintă numeroase invaginări care realizează fanta sinaptică secundară. Totalitatea acestor falduri membranare corespunde, la microscopul optic, la ceea ce s-a descris clasic drept „aparat subneural". Semnificația invaginărilor membranei subsinaptice este creșterea suprafeței receptoare postsinaptice, în care sînt localizați receptorii pentru acetilcolină (cu o densitate de 15 000—20 000/μm^2) și acetilcolinesteraza reprezintă *marker*-i funcționali ai membranei subsinaptice, care fac din acest sector al sarcolemei un microdomeniu cu alcătuire moleculară deosebită de restul sarcolemei. Membrana subsinaptică este în ultimă instanță un traductor chemo-electric care transformă mesajul chimic al acetilcolinei

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

într-un semnal electric. Cuante unice de acetilcolină sînt descărcate spontan și continuu din presinapsă și produc mici depolarizări ale membranei subsinaptice (potențiale miniaturale de placă motorie). Sosirea unui impuls nervos în presinapsă descarcă sincron cca 100 de cuante de acetilcolină, ceea ce corespunde la cca 2 milioane de molecule de acetilcolină care traversează fanta sinaptică și produc potențialul propriu-zis de placă motorie. Aceasta, atingînd o valoare-prag, declanșează unda de depolarizare ce se propagă în toată sarcolema și apoi în interiorul fibrei musculare prin sistemul T (vezi cuplarea excitație-contracție).

Receptorul pentru acetilcolină din sarcolema subsinaptică. Cercetări din ultimii ani, efectuate în special de grupul lui De Robertis la Buenos Aires și cel a lui Changeux la Paris, au permis elucidarea în detaliu a anatomiei moleculare a receptorului pentru acetilcolină. Acesta este un pentamer proteic, alcătuit din două subunități alfa și cîte o unitate beta, gamma și delta. Structura primară — secvența de aminoacizi — a acestor patru tipuri de polipeptide este complet descifrată. Polipeptidele componente ale receptorului sînt dispuse în sarcolemă ca proteine transmembranare, integrale.

Miasthenia gravis — boală de placă motorie. Miasthenia gravis este o boală de cauză necunoscută, la baza căreia stă prezența de *anticorpi anti-receptor pentru acetilcolină* de la nivelul sarcolemei subsinaptice a plăcii motorii. Boala se manifestă în principal prin slăbiciunea musculară, în special a mușchilor extremității craniale a corpului, și poate fi ameliorată prin administrare de droguri colinergice. Electronomicroscopic, numărul de falduri ale sarcolemei subsinaptice este redus. Imunocitochimic, anticorpii anti-receptori pentru acetilcolină pot fi evidențiați în membrana subsinaptică. Trebuie subliniat faptul că acești anticorpi sînt împotriva unor determinanți antigenici ai receptorului pentru acetilcolină, alții decît locul de legare a acetilcolinei de receptor. Probabil că legarea anticorpilor de receptori determină internalizarea prin endocitoză a complexului anticorp-receptor și rezultatul este scăderea numărului de receptori pentru acetilcolină disponibil în sarcolema subsinaptică.

8.2.1.8. Inervația senzitivă a fibrelor musculare scheletice. Fusuri neuromusculare

Mușchii scheletici conțin numeroase terminații senzitive, unele dintre ele fiind simple terminații amielinice (terminații epilemale), dispuse spiralat în jurul fibrelor musculare, în timp ce altele sînt formațiuni cu o organizare complexă și specifică și se numesc fusuri neuromusculare sau, simplu, fusuri musculare.

Fusul neuromuscular (fig. 8.54) are formă ovoidă, alungită, cu dimensiunile aproximative 1—3 mm lungime și 0,2 mm grosime, și constă dintr-o capsulă conjunctivă, care acoperă cîteva fibre musculare striate, modificate, asociate cu terminații nervoase senzitive și motorii. Spațiul dintre capsulă și fibrele musculare din interiorul lui este denumit *spațiu periaxial*, are grosimea maximă de 100 μm și este plin cu un lichid a cărui compoziție nu este cunoscută.

Distribuția fusurilor neuromusculare în mușchii scheletici la om. Numărul de fusuri neuromusculare variază de la un mușchi la altul, atît ca număr absolut cît și ca număr pe unitatea de volum. Astfel, în *lattisimus dorsi* s-au găsit

368 de fusuri neuromusculare, cu o densitate de 1,4 fusuri/g de mușchi. În *abductor pollicis brevis* s-au numărat 80 de fusuri neuromusculare, corespunzînd însă unei densități de 29,3 fusuri/g de mușchi. Cea mai mare densitate de fusuri neuromusculare a fost găsită în mușchii extrinseci ai globilor oculari și în cei ai laringelui. De regulă, într-un mușchi, fusurile neuromusculare sînt mai numeroase spre joncțiunea cu tendonul.

Fibrele musculare din fusul neuromuscular (din interiorul capsulei) sînt denumite *fibre intrafuzale*, tocmai pentru a fi deosebite de restul fibrelor musculare din mușchiul respectiv, care, în acest context, sînt denumite *fibre extrafuzale*. Numărul de fibre intrafuzale variază de la cîteva pînă la 20, în mod obișnuit fiind de 5—7.

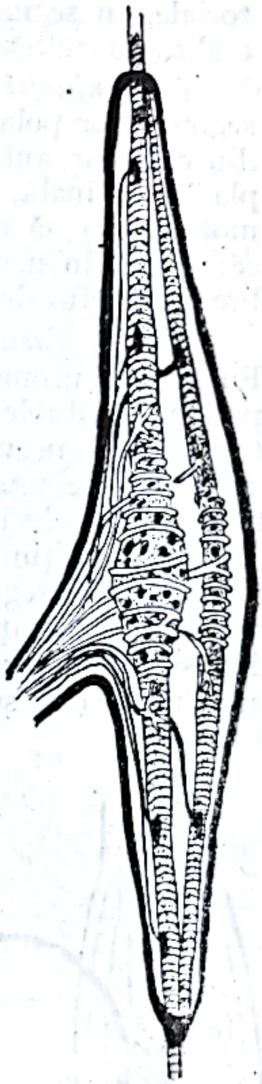


Fig. 8. 54. — Schema alcătuirii unui fus neuromuscular.

8.2.1.8.1. Fibrele intrafuzale

Fibrele intrafuzale au drept principală particularitate faptul că porțiunea lor mijlocie este necontractilă, datorită absenței locale a miofibrilelor și deci nu este nici striată. Pentru scopuri descriptive se disting trei zone într-o fibră musculară intrafuzală: o *zonă ecuatorială*, centrală, și două zone — *segmente polare* — mai lungi, care se îngustează progresiv spre extremitățile fusului. După structura porțiunii ecuatoriale, fibrele intrafuzale sînt de două feluri: fibre cu sac nuclear și fibre cu lanț nuclear. Prezentăm în continuare, comparativ, principalele lor caracteristici histologice.

	Fibre musculare intrafuzale	
	cu sac nuclear	*cu lanț nuclear*
Dispoziția nucleilor în regiunea centrală (nestriată)	aglomerări (140—150) care „umflă fibra"	în monom, în axul fibrei
Număr	mai puține	mai multe
Grosime	mai groase	mai subțiri
Lungime	mai lungi, se extind extracapsular, atașîndu-se de endomisiul fibrelor musculare extrafuzale	mai scurte, se atașează de capsulă la polii fusului sau se atașează de teaca fibrelor cu sac nuclear

8.2.1.8.2. Terminații nervoase în fusul neuromuscular

*Terminații senzitive primare** (anulospirale). Fiecare fus neuromuscular primește o fibră nervoasă senzitivă groasă (tip Ia), cu origine în ganglionul spinal, care dă cîteva ramificații nemielinizate ce se termină într-un sistem complex de spirale și inele în jurul regiunii ecuatoriale a fibrelor intrafuzale.

* Se preferă terminologia: terminații primare și secundare, față de anulospirale și eflorescente, deoarece configurația terminațiilor variază de la o specie la alta. Spre exemplu, la om, terminațiile primare pot fi *uneori* eflorescente și nu anulospirale.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste terminații nervoase au un rol foarte important în controlul reflexelor spinale monosinaptice (miotatice).

Terminații senzitive secundare (eflorescente). Acestea sînt terminații nervoase ale unor fibre nervoase mai subțiri, care se dispun mai ales la nivelul fibrelor musculare intrafuzale cu sac nuclear, de o parte și alta a regiunii ecuatoriale, în segmentele polare. Aceste terminații sînt implicate mai ales în realizarea reflexelor polisinaptice.

Terminații nervoase motorii sînt prezente pe fibrele intrafuzale, la nivelul segmentelor polare. Ele reprezintă terminații ale axonilor neuronilor gamma din coarnele anterioare ale măduvei spinării și configurația lor este de tip placă terminală, la fel ca în cazul fibrelor extrafuzale. Rolul acestor terminații motorii este să regleze sensibilitatea fusului neuromuscular la întindere. Descărcările din neuronii gamma contractă porțiunile contractile polare ale fibrelor intrafuzale, crescînd sensibilitatea porțiunilor lor ecuatoriale la întindere.

Rolul fusurilor neuromusculare: traductori miniaturali de tensiune. Fusurile neuromusculare au rolul de receptori de întindere, fiind așezate paralel cu fibrele extrafuzale. Frecvența de descărcare a impulsurilor de către terminațiile nervoase senzitive din fusul neuromuscular este porporțională cu starea de tensiune a fibrelor intrafuzale. Activitatea neuronilor gamma menține fibrele intrafuzale într-o anumită stare de tensiune, ca urmare a întinderii porțiunii ecuatoriale necontractile a fibrelor intrafuzale, cauzată de contracția segmentelor polare. Gradul de întindere este suficient pentru a menține terminațiile nervoase senzitive din fus într-o stare de excitație imediat sub prag. Întinderea mușchiului produce o creștere a tensiunii în fibrele intrafuzale (un surplus de întindere al zonei ecuatoriale necontractile), ceea

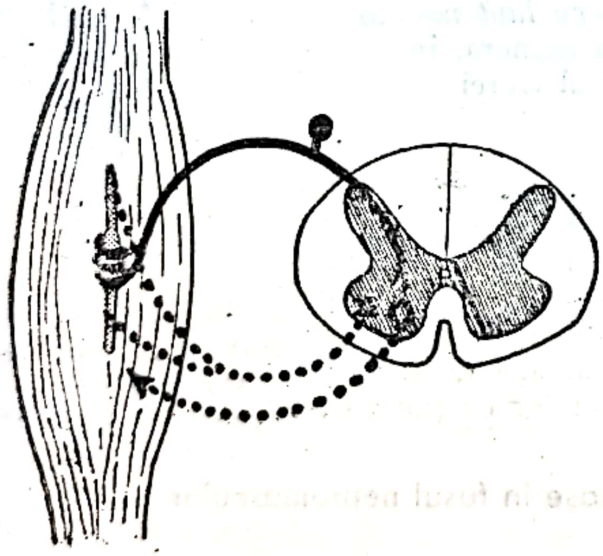


Fig. 8. 55. — Schema mecanismului *feed back* de control al tonusului fibrelor musculare scheletice în care un rol esențial îl au fusurile neuromusculare.

ce are ca rezultat descărcarea de impulsuri de către terminațiile nervoase senzitive. Prin contracția mușchiului (a fibrelor extrafuzale) starea de tensiune a fibrelor intrafuzale se reduce și fibrele nervoase senzitive încetează descărcarea de impulsuri. Este vorba deci de un mecanism de control de tip *feed — back* al stării de contracție a mușchiului (așa-zisul circuit gamma) (fig. 8.55).

Scanned with OKEN Scanner

8.3. ȚESUTUL MUSCULAR CARDIAC

Celulele musculare cardiace se clasifică în două mari categorii, corespunzător funcției pe care o îndeplinesc, astfel:

a) celulele miocardice lucrătoare, a căror funcție este contracția;

b) celule nodale (sinonime: celule excito-conductoare, celule cardionectoare), avînd funcția de a genera și conduce impulsuri (electrice).

Cele două tipuri de miocardocite au și o organizare structurală diferențiată, fiind deosebite morfologic.

Celulele miocardice lucrătoare formează masa miocardului contractil atrial și ventricular.

Celulele nodale sînt dispuse în masa miocardului contractil sub formă de aglomerări distincte, constituind: nodul sinusal, nodul atrio-ventricular, fasciculul His și rețeaua Purkinje, aceste formațiuni fiind reunite în mod obișnuit sub termenul generic de țesut excito-conductor cardiac (fig. 8.56) și tabelul 8.XVI).

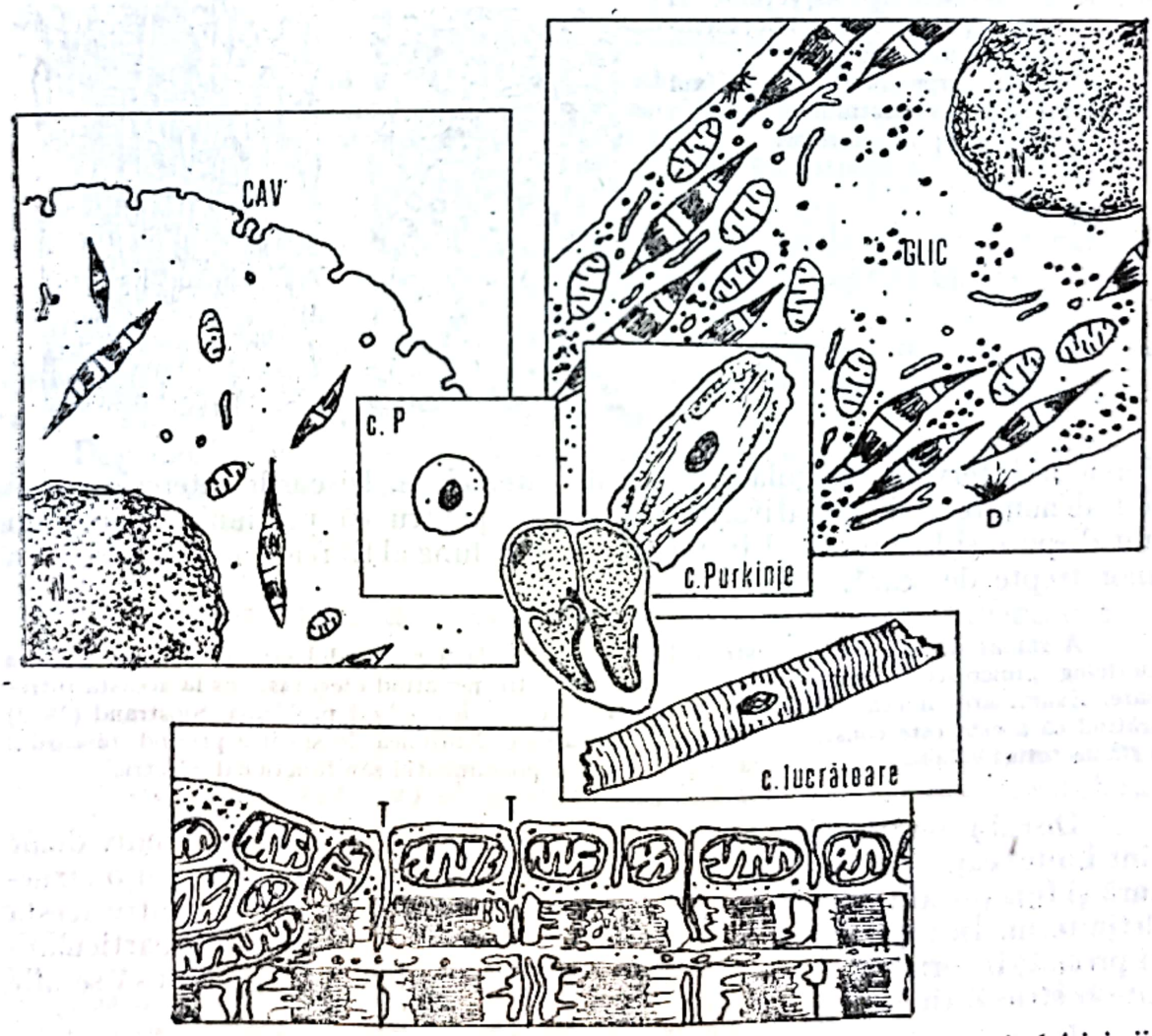


Fig. 8. 56. — Schema principalelor tipuri de miocardocite și a topografiei lor la nivelul inimii: *C* — celulă; *CAV* — caveole; *Glic* — glicogen; *N* — nucleu; *D* — desmozom; *T* — tubi T.

Scanned with OKEN Scanner

8.3.1. MIOCARDOCITELE LUCRĂTOARE VENTRICULARE

Structura generală a miocardului contractil constă din fascicule a căror dispunere creează aspectul unei rețele plexiforme, masa citoplasmatică avînd striații transversale, identice de altfel cu aspectul striat al fibrelor musculare scheletale (fig. 8.57).

Din loc în loc sînt vizibile, mai ales pe preparatele colorate cu hematoxilină ferică sau hematoxilină fosfotungstică, dar nu pe cele colorate cu hemalaun-eozină, linii transversale, intens colorate, care intersectează complet

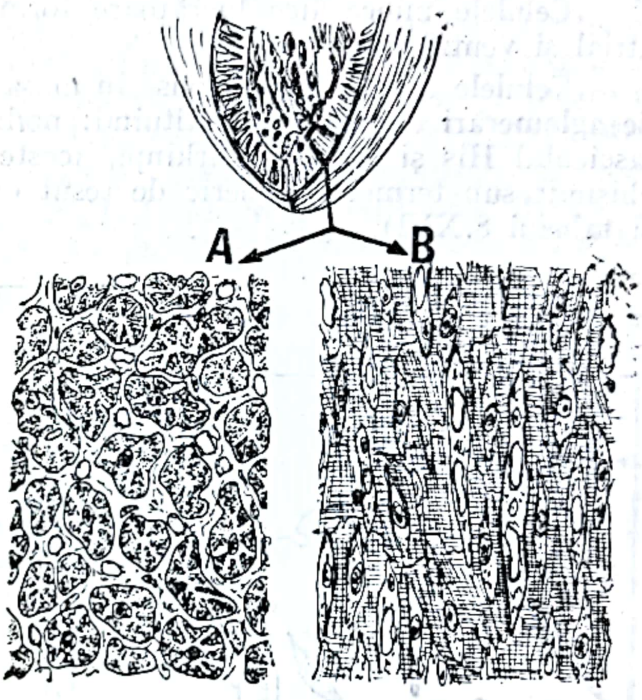


Fig. 8. 57. — Schema aspectului la microscopul optic al miocardocitelor lucrătoare ventriculare:
A — secțiune perpendiculară pe axul lung al fibrelor; *B* — secțiune paralelă cu axul lung al fibrelor.

fibrele la intervale neregulate, discurile intercalare. Discurile intercalare mai sînt denumite strii scalariforme (Eberth), pentru că porțiuni ale discului sînt dispuse și longitudinal în raport cu axul lung al fibrelor, creînd imaginea unor trepte de scară.

A rămas doar de interes istoric lunga dispută dacă miocardul este sau nu un sincițiu morfologic, microscopia optică, datorită slabei rezoluții, neputînd oferi răspuns la această întrebare. Examinarea miocardului la microscopul electronic a rezolvat problema, Sjöstrand (1953) arătînd că acesta este constituit din fibre individuale. Noțiunea de sincițiu privind miocardul a rămas totuși valabilă doar în ceea ce privește comportamentul său funcțional (electric).

Discul intercalar este locul unde celulele musculare cardiace individuale sînt unite cap la cap, discul reprezentînd un complex joncțional cu o structură și funcționalitate specială, existent numai în miocard, fiind pentru acesta definitoriu. În raport cu striațiile fibrelor, discul are o dispoziție particulară și precisă, invariabilă, la nivelul benzilor I, acolo unde ar fi trebuit să se afle cîte o strie Z (înlocuiește deci banda Z).

Rețeaua cu aspect anastomotic a miocardului este constituită deci din entități celulare bine individualizate (fig. 8.58).

Scanned with OKEN Scanner

Fibrele cardiace au formă aproximativ cilindrică, în medie 100 micrometri lungime şi 15 micrometri lăţime (Truex, 1972). Se apreciază că numărul miocardocitelor ventriculare lucrătoare, la om, este de 2×10^9 (Adler, 1972).

Diametrele celulelor miocardice ale tuturor mamiferelor, indiferent de mărimea animalului, sînt aproximativ aceleaşi. În condiţii de hipertrofie, ele se pot mări ajungînd la valori de 30 micrometri şi, uneori, mai mult.

Fibrele musculare cardiace au în general un singur nucleu, uneori doi, plasat central, cu axul mare situat în lungul celulei. El este înconjurat de o porţiune de citoplasmă în care lipsesc striaţiile. În spaţiul sarcoplasmatic

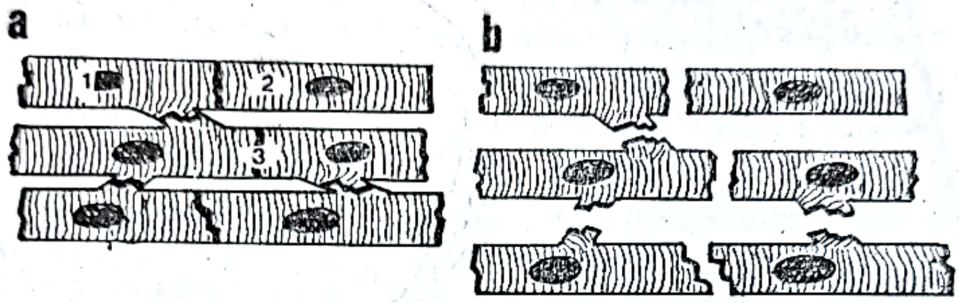


Fig. 8. 58. — Miocard ventricular lucrător (schemă): *a* — se observă aranjarea fibrelor musculare în reţea; *b* — aspectul individual al miocardocitelor după detaşarea lor la nivelul discurilor intercalare; *1* — nucleu; *2* — striaţii transversale; *3* — disc intercalar.

lipsit de striaţii, de la polii nucleului, sînt vizibile granule de pigment gălbui, aşa-zisul „pigment de uzură", lipofuscina, de natură lipoproteică, care creşte cantitativ odată cu înaintarea în vîrstă.

Între fasciculele anastomotice formate din celule miocardice se află puţin ţesut conjunctiv, acesta echivalînd cu endomisiul, în care se află capilare sanguine, limfatice şi fibre nervoase.

Deşi morfologic au aspect de muşchi striat, fibrele musculare cardiace se contractă involuntar, contracţiile sînt ritmice şi permanente iar muşchiul nu oboseşte niciodată.

8.3.1.1. Ultrastructura miocardocitelor lucrătoare ventriculare

8.3.1.1.1. Învelişul celular (sarcolema)

Electronomicroscopic se descriu învelişului celular, de la interior către exterior, trei componente: *a)* plasmalema, *b)* lama bazală, *c)* lama reticulară (stratul de fibrile de colagen) (fig. 8.59 şi 8.60).

Plasmalema, de aspect trilaminat, are cca 9 nm grosime. Învelişul de tip membrană bazală are aspect electronodens, comparat de obicei cu o pîslă, avînd o grosime relativ uniformă, de aproximativ 30 nm şi este denumit *lamina densa*. Aceasta este separată de plasmalemă printr-un spaţiu clar de aproximativ 20 nm, denumit *lamina rara* sau *lamina lucida*. Întregul înveliş este format din glicoproteine şi colagen de tip IV. Lama reticulară formată din straturi de fibrile de colagen se continuă cu spaţiul extracelular propriu-zis, situat între celulele musculare cardiace.

Scanned with OKEN Scanner

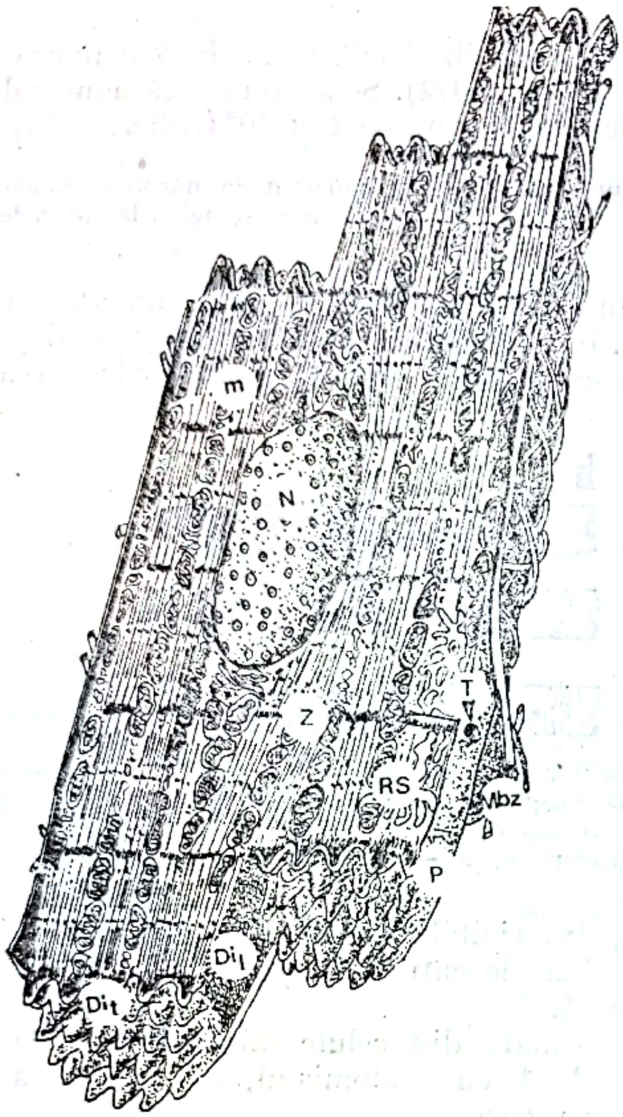
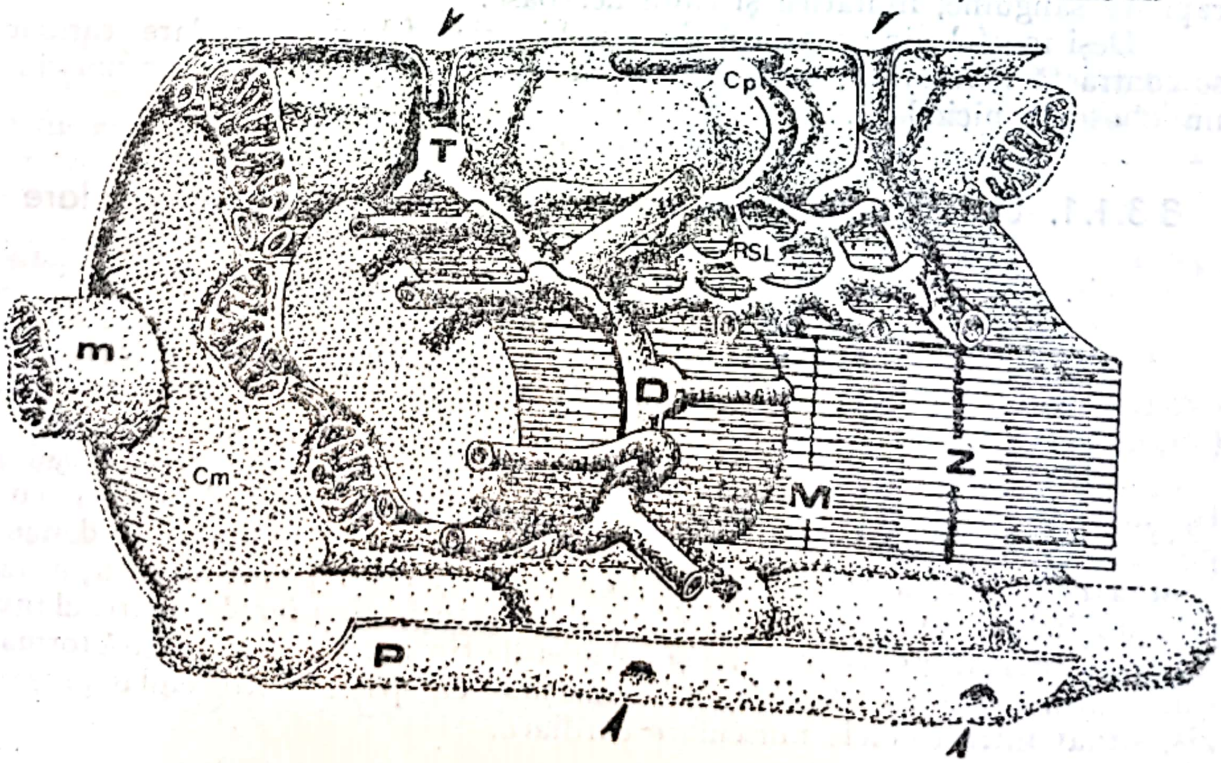


Fig. 8. 59. — Schema aspectului ultrastructural al miocardocitului ventricular lucrător (secțiune longitudinală): *p* — plasmalemă; *Mbz* — învelișul celular tip membrană bazală; *T* — tub T; *RS* — reticul sarcoplasmatic; *Z* — banda Z; *m* — mitocondrii dispuse în șiruri; Di_t — disc intercalar, porțiunea transversală; Di_1 — disc intercalar, porțiunea longitudinală.

Fig. 8. 60. — Schema ultrastructurii fibrei miocardice ventriculare lucrătoare (aspect tridimensional): *P* — plasmalemă; *m* — mitocondrie; *T* — tubuli T; ⟩ — orificiile tubilor T la suprafața plasmalemei, fomați de invaginarea acesteia; *RSL* — reticul sarcoplasmatic liber; *Cp* — contact periferic al RSJ cu sarcolema; *D* — diadă; *Cm* — cîmpuri de miofilamente *(Felderstruktur)*: *Z* — bandă Z ; *M* — linie M.



Scanned with OKEN Scanner

În descrierea morfologiei ultrastructurale a plasmalemei se disting:
— plasmalema de la suprafața fibrei (plasmalema periferică);
— sistemul T (sistemul tubular, transvers, plasmalema care formează invaginațiile tubulare, plasmalema internă).

a) Plasmalema periferică. Are aspect ondulat, porțiunile bombate corespunzînd mitocondriilor aflate dedesubt, imediat subplasmalemal, iar adînciturile găsindu-se în dreptul benzilor Z.

Depresiunile plasmalemei sînt înguste și adînci; din ele iau naștere tubii transversali care pătrund în interiorul celulei. În dreptul benzilor Z, plasmalema este atașată ferm de banda Z prin filamente de ancorare ale citoscheletului exosarcomeric.

Plasmalema periferică și cea internă au numeroase invaginări: caveole, vezicule acoperite și invaginări cu morfologie neregulată.

8.3.1.1.2. Discurile intercalare

Discurile intercalare se găsesc localizate numai la nivelul plasmalemei periferice. Acestea sînt asocieri de joncțiuni celulare, cu rol de a asigura coeziunea celulelor musculare cardiace și de a le cupla funcțional (electric). Nu întreaga suprafață a plasmalemelor care formează discul este purtătoare de joncțiuni, existînd și zone de plasmalemă fără astfel de dispozitive, de atașare intercelulară.

Discurile intercalare sînt dispuse transversal în raport cu fibrele, plasmalemele celulelor care vin în contact se interdigitează dînd aspectul caracteristic de zig-zag. În raport cu axul longitudinal al fibrelor musculare, un disc intercalar cuprinde porțiuni transversale și porțiuni longitudinale (vezi fig. 8.59 și 8.61).

Tipul joncțiunilor care se găsesc la nivelul fiecărei porțiuni a discului diferă, conferindu-le din punct de vedere funcțional semnificație diferită: porțiunea transversală are rolul de a solidariza celulele între ele, cea longitudinală este răspunzătoare de conducerea intercelulară (cuplarea electrică).

Porțiunea transversală (aflată de fapt în dreptul benzii Z) are două tipuri de joncțiuni, dispuse una lîngă alta, și anume: *fascia adherens* (joncțiune intermediară) și *macula adherens* (desmozomi). Pe fața internă, subplasmalemal, se găsește un material electronodens, de care se prind filamentele de actină. Acesta e format din vinculină, o proteină care are capacitatea de a atașa actina. În materialul electronodens, paralele cu plasmalema, se găsesc filamente aparținînd citoscheletului exosarcomeric.

În raport cu celelalte joncțiuni, în cadrul discului, *fascia adherens* este joncțiunea care acoperă cea mai mare suprafață, *macula adherens* ocupînd o suprafață mult mai mică (diametrul acesteia fiind de 30—200 nm), la ambele joncțiuni spațiul interplasmalemal măsurînd 20 nm.

Distrugerea desmozomilor și joncțiunilor de tip *fascia adherens* cu EDTA nu abolește cuplarea electrică dintre celule, demonstrînd rolul lor doar în adezivitatea intercelulară și prevenind alunecarea fibrelor între ele în timpul contracției.

În porțiunea longitudinală a discului intercalar este prezent doar un singur tip de joncțiune, *macula communicans (nexus*, joncțiunea *gap*).

Scanned with OKEN Scanner

Acest tip de joncțiune se află și între alte specii celulare (epiteliale, celule musculare netede) dar niciodată între fibrele scheletale.

Nexusul este un component specific și constant al discurilor intercalare, fiind întotdeauna localizat numai la nivelul porțiunii longitudinale a acestuia, paralel cu axul lung al celulelor.

Fețele interne ale plasmalemelor, care formează joncțiunile de tip nexus, nu au atașat material electronoopac.

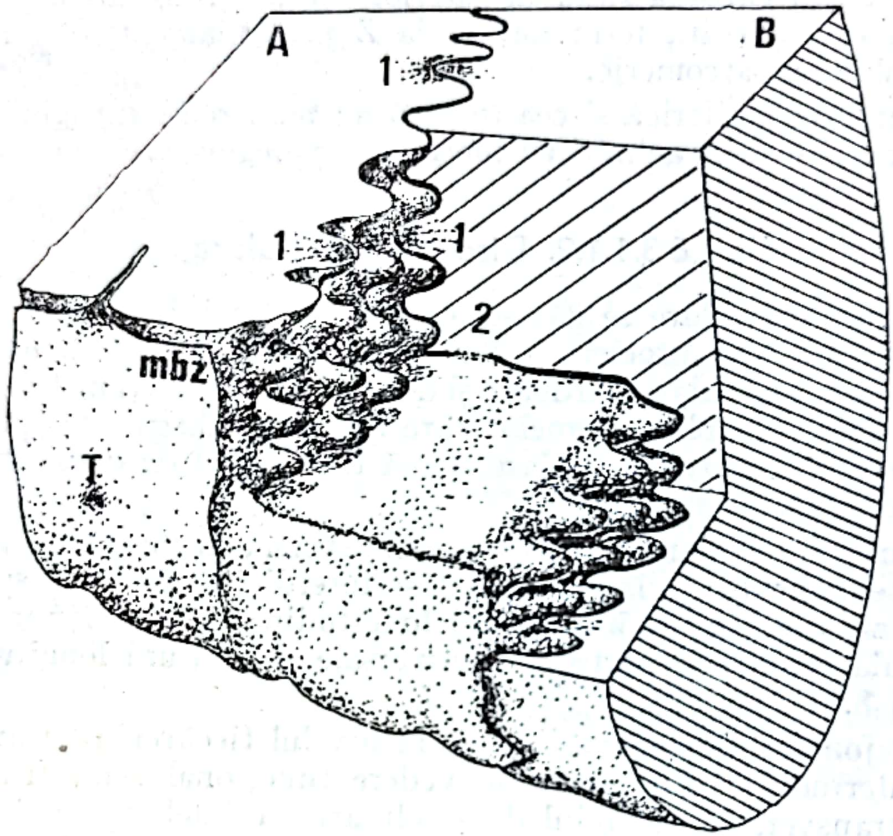


Fig. 8. 61. — Schema aspectului tridimensional al discului intercalar:
A — celula *A*; *B* — celula B; *1* — desmozomi; *2* — nexus; *T* — tubi T; *mbz* — învelișul celular tip membrană bazală.

Nexusul este format de cele două plasmaleme adiacente, fiecare cu dimensiunea de 9—10 nm, separate de un spațiu de 2 nm. Fiecare plasmalemă și spațiu dintre ele sînt străbătute de formațiuni proteice tubulare, strîns apoziționate față în față. Canalul, situat central, care străbate fiecare formațiune proteică și îi conferă aspectul tubular, devine continuu, permițînd comunicarea directă între citoplasmele celor două celule. Formațiunile proteice sînt numite conexoni. Altfel spus, fiecare nexus este format din două șiruri de conexoni, aparținînd cîte unul fiecărei plasmaleme. Conexonii sînt strîns alipiți în spațiul extracelular și așezați în așa fel încît canalele lor centrale devin continue. Conexonii sînt dispuși în planul membranei în mod particular, formînd rețele hexagonale (fig. 8.62).

La mamifere, joncțiunile *gap* reprezintă 10—13% din suprafața discului intercalar, reprezentînd aproximativ 1% din suprafața plasmalemei

Scanned with OKEN Scanner

miocardocitului, numărul conexonilor într-o joncțiune *gap* iind apreciat la 12 000—17 000/μm².

Fiecare conexon constă din 6 subunități proteice care străpung bistratul lipidic membranar, depășindu-l cu 1,5 nm extracelular (domeniul extracelular al subunității) și cu 0,5—1 nm spre citioplasmă (domeniul intracelular). Domeniul intracelular constituie loc de inserție a proteinelor citoscheletale. Subunitățile fiecărui conexon circumscriu o porțiune centrală goală, canalul. Canalul conexonului reprezintă o fază apoasă prin care pot trece nucleotide, aminoacizi, oligozaharide, mesageri intracelulari; moleculele cu greutate moleculară peste 900 nu pot parcurge canalul, diametrul lor trebuind să fie 1,6—2 nm. În interior canalul este încărcat electronegativ, astfel că moleculele neutre trec mai ușor decît cele electronegative. Canalul are un mecanism tip „poartă" care-i asigură selectivitatea și aceasta este reprezentată de domeniul intracitoplasmatic. Poarta închide sau deschide canalul, fiind reglată de ionii de calciu, hidrogen și diferențele de potențial transmembranare. Modularea funcționării canalului se face și prin nucleotide ciclice, prin fosforilarea proteinelor ce compun conexonul sau prin calmodulină, care se poate lega de domeniul intracitoplasmatic (vezi fig. 8.62).

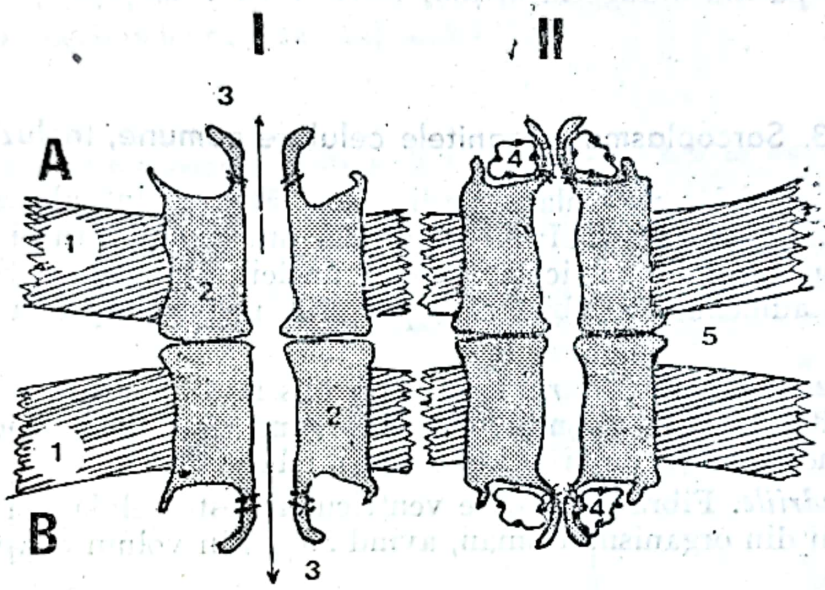


Fig. 8.62. — Modelul ipotetic al conexonilor care formează joncțiunile de tip *gap* și al reglării prin calmodulină (CaM) a canalului acestora;
1 — bistrat lipidic; *2* — conexon; *3* — poarta canalului; *4* — CaM *5* — spațiu intercelular; *A* — celula A; *B* — celula B; *I* — canalul în starea „deschis"; *II* — canalul în starea „închis".

Nexusurile reprezintă locuri cu rezistență electrică scăzută intercelulară (de aproximativ 2 000 de ori mai mică decît în restul sarcolemei), unde are loc cuplarea electrochimică între celulele miocardului *. Distrugerea nexusurilor, de exemplu cu soluții hipertone, abolește cuplarea electrică între celule.

În afara discurilor intercalare, fețele laterale ale miocardocitelor, paralele cu axul lung al acestora, sînt larg separate, spațiul dintre ele putînd fi vizibil la microscopul optic.

b) Plasmalema internă ** (sistemul tubular transversal, sistemul T)

Sistemul T este format din invaginări tubulare ale plasmalemei, care se extind transversal în interiorul fibrei. Sistemul T se continuă cu plasmalema

* Numărul minim de conexoni care asigură cuplarea a două celule, apreciat pe culturi de miocardocite, pare a fi 30—40.

** Dintre vertebrate, numai miocardocitele lucrătoare ale mamiferelor au sistem T (tabelul 8.XVI).

Scanned with OKEN Scanner

periferică *, luînd naștere, de regulă, din adînciturile pe care aceasta le face în dreptul fiecărei benzi Z, lumenul tubilor continuîndu-se cu spațiul extracelular (vezi fig. 8.60, 63).

Orificiile de deschidere ale tubilor T în miocardocite sînt mult mai largi decît ale celor din fibra scheletală (aproximativ 200 nm față de 20—50 nm).

Plasmalema sistemului T cardiac are caveole, în timp ce acestea lipsesc în sistemul T din fibra scheletală.

Tubii T formează în miocardocit ramificații longitudinale, dispuse în lungul celulelor, ramificații cu diametrul mic și uniform, legînd sistemele T între ele.

O posibilă semnificație funcțională a prezenței tubilor T în miocardocitele ventriculare lucrătoare este următoarea: cînd acestea se hipertrofiază, diametrul lor putînd ajunge la 30 μm, nu este întîrziat accesul calciului la miofibrile **.

8.3.1.1.3. Sarcoplasma, organitele celulare comune, incluziuni ***

Nucleii celulelor musculare cardiace lucrătoare sînt alungiți, valorile medii ale diametrelor acestora fiind 8,8 μm/2,3 μm. Ei sînt situați central **** în celulă și nu au nimic particular față de nucleii altor celule. Sînt prezente indentații de adîncime variabilă care pot crea uneori impresia unor nuclei multipli.

Reticulul endoplasmatic rugos nu este observat în celulele cardiace lucrătoare adulte. În mod obișnuit, există în zona centrală a miocardocitelor cîteva cisterne ale reticulului avînd atașați ribozomi.

Mitocondriile. Fibra lucrătoare ventriculară este celula cea mai bogată în mitocondrii din organismul uman, avînd 35% din volum ocupat de aceste organite.

Mitocondriile sînt în proporție de 4—6% în fibra scheletală, 15% în hepatocit și 27% în celula parietală gastrică.

Mitocondriile cardiace pot fi lungi, diametrul lor longitudinal putînd ajunge uneori la 6—8 μm (o singură mitocondrie se poate găsi astfel în lungul a 3—4 sarcomere.) Mitocondriile au criste numeroase.

Este descrisă asocierea (contacte strînse) dintre mitocondrii și cisterne ale reticulului sarcoplasmatic, situație întîlnită destul de frecvent în miocardocite.

Numărul mitocondriilor pe gram de țesut miocardic este apreciat la 250 miliarde. Cantitatea imensă a mitocondriilor are consecințe extrem de importante pentru funcționalitatea celulei cardiace lucrătoare.

---

* Date recente sugerează că organizarea moleculară a plasmalemei tubilor T și plasmalemei periferice este deosebită.

** Celulele care nu au sistem T (celulele nodale) nu se hipertrofiază.

*** Vezi tabelul 8.XIV.

**** Situarea și numărul nucleilor în miocardocite reprezintă criterii de diagnostic diferențial histologic față de fibrele scheletale.

Scanned with OKEN Scanner

O primă consecință este producerea unei cantități foarte mari de ATP, fibra musculară cardiacă conținînd o neînsemnată cantitate de creatinofosfat. Mai mult, fibra cardiacă este aproape lipsită de enzimele glicolizei anaerobe, ATP-ul fiind obținut aproape în exclusivitate prin fosforilare oxidativă (aerob). O altă consecință a numărului mare de mitocondrii (sediul beta-oxidării acizilor grași, al ciclului Krebs) este că acest tip de celulă poate utiliza numeroase substraturi pentru obținerea energiei: acizi grași liberi, glucoză, lactat, cetone, folosind preferențial însă, acizii grași.

Miocardocitele, conținînd un număr mare de unități ale fosforilării oxidative (aproximativ 1,5 m² de membrană internă mitocondrială/gram de țesut) și neputînd face datorie de oxigen, sînt extrem de sensibile la hipoxie. Astfel, întreruperea fluxului sanguin coronarian (obstrucție coronariană de diverse etiologii) duce în cîteva secunde la scăderea mare a forței de contracție și în cîteva minute la moarte celulară. Este șirul de evenimente care se produc în infarctul miocardic acut.

Lizozomii primari sînt rari. Mult mai obișnuit se observă corpi reziduali, sub forma granulelor de lipofuscină (pigment de îmbătrînire), localizate în regiunea perinucleară (tabelul 8.XIV).

TABELUL 8.XIV

Volumul unor componente celulare exprimat procentual față de volumul total al fibrei musculare cardiace la om (după Page, 1973, 1975)

Componenta celulară	Volumul ocupat (procente din volumul total al fibrei)
Nucleu	2
Miofibrile	50
Mitocondrii	35
Sistemul T	1
Reticul sarcoplasmic	7
Reticul joncțional	0,5
Reticul liber	6,5
Granule lipidice	0,1
Lipofuscină	1*

* La 25 de ani — 1%; la 35 de ani — 2,5% la 65 de ani — 3,5%; la 80 de ani— 5% (Strehler și colab., 1959).

Aparatul Golgi este prezent, veziculele golgiene fiind destul de numeroase.

Peroxizomii sînt prezenți și localizați adesea la nivelul benzii Z.

În zona perinucleară se observă uneori cîte un *centriol* și *microtubuli*.

Granulele de glicogen sînt vizibile în cantitate relativ mare în celulele musculare cardiace, atît sub formă de grămezi cît și dispersate în spațiile interfibrilare, unde sînt dispuse în șiruri între miofilamente, fiind mai numeroase la nivelul benzii I. Granulele de glicogen sînt sferice, cu diametrul de 80—40 nm.

Granulele lipidice se constată frecvent, mai ales în apropierea mitocondriilor.

Componente ale citoscheletului sînt prezente și în fibra cardiacă fiind cunoscută doar organizarea citoscheletului exosarcomeric, care este identică cu cea din celula musculară scheletală (vezi fibra scheletală).

Scanned with OKEN Scanner

8.3.1.1.4. Materialul contractil

Miofilamentele constituie aproximativ 50% din volumul celulei cardiace, ele deosebindu-se ca dispunere față de fibra scheletică. În miocardocit miofilamentele sînt aranjate într-o manieră continuă și numai parțial împărțite în fascicule de mărime variată de către matricea celulară interfibrilară. Electronomicroscopic, pe secțiuni transversale, fibrele musculare cardiace au un aranjament geometric neregulat al miofilamentelor — așa-zisul *„Felderstruktur"* (cîmpuri de miofilamente), opus dispoziției cu aspect regulat din fibra striată denumit *„Fibrillenstruktur"* (miofilamente aranjate în miofibrile) (vezi fig. 8.60).

Descripțiile din perioada de început a examinării mușchiului cardiac la microscopul electronic menționau prezența și în miocardocite a miofilamentelor grupate, denumite convențional miofibrile, identice cu aspectul acestora din fibra scheletică. Aceasta s-a datorat artefactelor de fixare, inerente la acea dată, precum și examinării și interpretării mai ales a imaginilor oferite de dispunerea miofilamentelor în secțiunile longitudinale ale miocardocitelor (vezi fig. 8.59).

Evenimentul contractil fundamental este în miocardocitul ventricular lucrător, probabil ca și în mușchiul scheletic, atașarea și dispunerea ciclică a punților transversale între filamentele groase și subțiri făcînd ca filamentele subțiri să alunece în lungul filamentelor groase, către centrul benzii A. Rezultatul acestui proces este scurtarea sarcomerelor și, implicit, a fibrei musculare cardiace și generarea forței de contracție (forța musculară).

Deși există o notabilă diferență, atît biologică cît și imunologică, între proteinele contractile cardiace și scheletale (spre exemplu miozina cardiacă și scheletală pot fi considerate izoenzime), proprietățile lor globale și structura electronomicroscopică apar în esență similare.

Viteza de contracție a fibrelor musculare depinde de viteza scindării ATP-ului de către ATP-aza miozinică.

Lanțurile ușoare ale miozinei fiind identice atît în miocardocitele normale cît și în cele hipertrofiate, baza moleculară a variațiilor proprietăților miozinei rezidă în diferențele existente între lanțurile grele miozinice, acestea conținînd locusul activității ATP-azice.

Lanțurile grele care intră în structura miozinei cardiace sînt de două feluri, distincte din punct de vedere chimic, fiind notate convențional α și β. Acestea se asociază în dimeri formînd trei tipuri de miozină care au viteză diferită de scindare a ATP-ului (izoenzime miozinice), notate V_1 ($\alpha\alpha$), V_2($\alpha\beta$), V_3($\beta\beta$). Miozina V_1 scindează rapid ATP-ul, V_3 mult mai lent. În condițiile creșterii moderate a presarcinii și/sau a postsarcinii este demonstrată sinteza preferențială a unei izoenzime miozinice cu funcție ATP-azică crescută, în timp ce creșterea mare a pre- sau/ și postsarcinii induce sinteza unei miozine cu funcție ATP-azică scăzută. La om și în toate modelele experimentale de hipertrofie cardiacă, instalarea insuficienței cardiace este însoțită de scăderea tuturor indicilor funcției contractile. Acest deficit este corelat cu scăderea activității ATP-azice miozinice, fibra musculară cardiacă conținînd o mare cantitate de miozină V_3.

Bazele ultrastructurale ale legii Starling

Capacitatea fibrelor musculare ventriculare de a-și varia forța de contracție de la o bătaie la alta, în funcție de lungimea lor inițială (telediastolică), este definită ca legea inimii a lui Starling.

Legea Starling are la bază relația dintre forța de contracție — gradul scurtării fibrei — și lungimea ei inițială, dependentă de dispoziția miofilamentelor în sarcomere. Lungimea sarcomerului ventricular de mamifer în

Scanned with OKEN Scanner

repaus are în medie 2,2 μm și reprezintă lungimea optimă pentru producerea unei tensiuni maxime, această lungime fiind atinsă la valoarea de 12 mmHg a presiunii de umplere ventriculare (limita superioară a normalului). La o presiune de 10 mm Hg a umplerii ventriculare sarcomerele tind să aibă cea mai mare lungime (2,25 μm) în fibrele situate în mijlocul peretelui ventricular, lungimea lor în fibrele situate subendocardic și subpericardic fiind mai mică de 2,25 μm. Creșterea presiunii de umplere ventriculară duce la creșterea lungimii sarcomerelor în toate fibrele musculare, indiferent de localizarea lor în peretele ventricular.

Recrutarea sarcomerelor mai scurte din grosimea peretelui ventricular, în condițiile creșterii marcate a presiunii de umplere ventriculară peste valorile normale, constituie (între anumite limite) una din principalele rezerve funcționale ale cordului.

8.3.1.1.5. Reticulul sarcoplasmatic (RS) și cuplarea excitație-contracție

Reticulul sarcoplasmatic este analog în fibra musculară cardiacă cu cel din fibra scheletală.

Gradul dezvoltării RS variază la vertebrate, fiind mai abundent în celulele musculare cardiace ale animalelor care au o frecvență mai mare a bătăilor și mai puțin abundent, la cele cu o frecvență mai mică a bătăilor cardiace.

Deși arhitectura generală a RS în fibra scheletică și cardiacă este asemănătoare, există între ele diferențe morfologice, și probabil funcționale, importante (fig. 8.63 și 8.64).

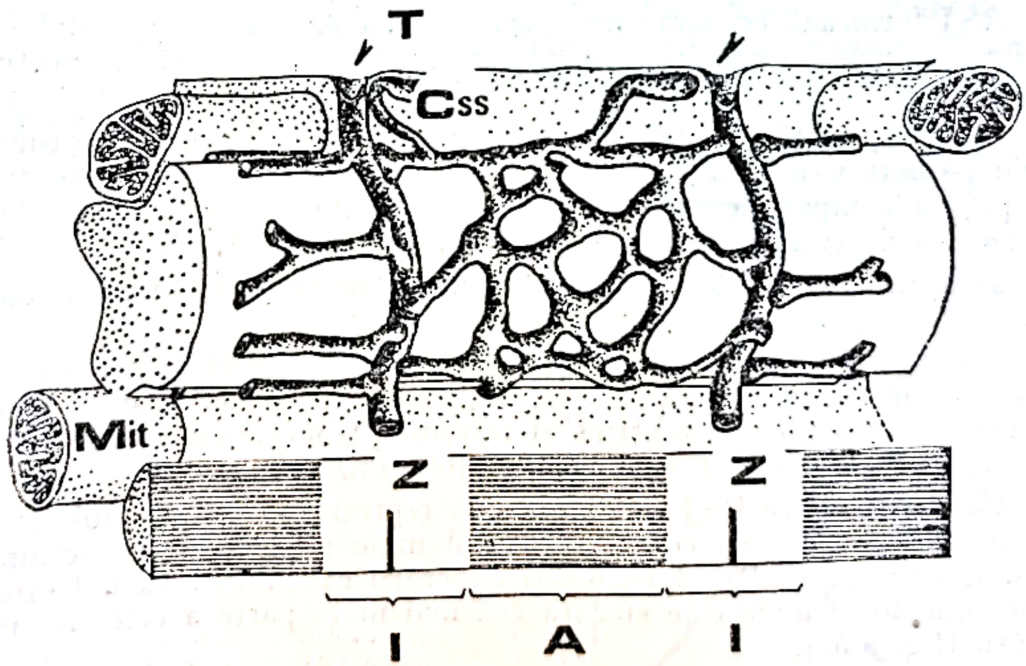


Fig. 8. 63. — Schema aspectului tridimensional al sistemului T și al reticulului sarcoplasmatic din miocardocitul ventricular lucrător:
T — tubi T; *Css* — cisternă subsarcolemală; *Mit* — mitocondrie; *Z* — bandă Z; *I* — bandă I; *A* — bandă A.

Scanned with OKEN Scanner

Nomenclatura folosită curent pentru descrierea RS din miocardocit, similară cu cea din fibra scheletală, este următoarea:

— RS liber;

— RS joncțional (RSJ). RSJ este subdivizat în fibra cardiacă în: extins, lamelar și corbular.

RS liber. Există două componente ale rețelei RS liber în sarcomer: *a)* cea de la nivelul liniei M și benzii Z (rețeaua M și rețeaua Z); *b)* tubulii longitudinali care leagă rețeaua M cu RSJ.

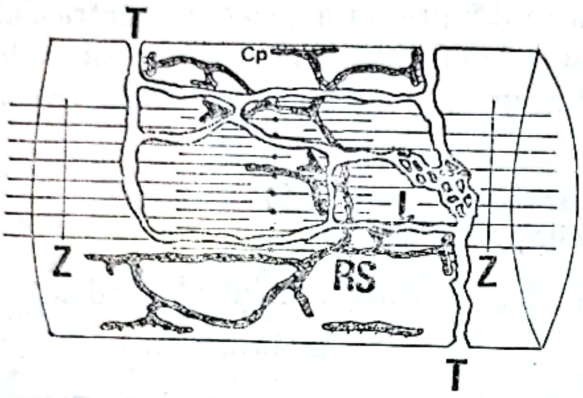


Fig. 8. 64. — Schema interrelațiilor sistemului T cu reticulul sarcoplasmatic în miocardocitul ventricular lucrător. Sistemul T, format din invaginările primare ale plasmalemei, dă naștere la tubuli transverși secundari și, de asemenea, unor ramificații longitudinale *(L)*. Ramurile longitudinale sînt legate între ele prin tubuli transverși terțiari, înguști la nivelul benzii A (capete de săgeată). La toate nivelurile sistemului T se creează contacte între acestea și cisternele reticulului sarcoplasmatic tubulii hașurați, marcați *RS*). Pe schemă sînt figurate de asemenea contactele periferice ale RS cu sarcolema (Cp).

Rețeaua M și Z sînt formate, fiecare, dintr-un sistem tubular interconectat, care înconjură parțial banda A și Z.

Filamente aparținînd citoscheletului ancorează sarcotubulii pe fața internă a plasmalemei.

RS joncțional este termenul sinonim pentru denumirea de cisterne terminale din fibra scheletală.

RSJ formează contacte atît periferice cît și interne care sînt dilatări sacciforme, închise, apoziționate plasmalemei periferice și, respectiv, sistemului T.

RSJ împreună cu sistemul T formează în miocardocit așa-numitele „diade", dilatații ale RSJ care înconjură parțial sau complet un tubul T (vezi pentru comparație „triadele" descrise la fibra scheletică). Diadele sînt un exemplu de contacte interne (vezi fig. 8.60, 8.63, 8.64).

Miocardocitele fără sistem T (celulele nodale) au numai contacte periferice.

S-a sugerat că RSJ și plasmalema ar putea fi conectate cel puțin intermitent și mofologic, această afirmație fiind susținută de cei care au descris cele două membrane unite strîns și formînd structuri cu aspect electronomicroscopic pentalaminat (Sommer și Johnson, 1979).

Contactele între RSJ și plasmalemă reprezintă, din punctul de vedere al cuplării excitației cu contracția, locul unde potențialul de acțiune este transformat în semnal declanșator al eliberării calciului, reticulul sarcoplasmatic fiind locul unde este stocată cea mai mare parte a calciului necesar cuplării (fig. 8.65).

Reticulul sarcoplasmatic din miocardocite conține calsechestrină, proteină cu mare afinitate pentru ionii de calciu, de prezența sa fiind legată capacitatea RS de a stoca ionii (vezi fibra scheletală). Calsechestrina este localizată cu precădere la nivelul RSJ.

Scanned with OKEN Scanner

Procesul cuplării excitației cu contracția începe odată cu depolarizarea sarcolemei, a cărei expresie este potențialul de acțiune (PA). În timpul fazei de platou a PA (fig. 8.66), ionii de Ca^{2+} din spațiul extracelular trec, prin canale specifice pentru Ca^{2+}, în mioplasmă (fig. 8.67 și vezi fig. 8.70). Trecerea lor creează curentul lent de intrare a calciului.

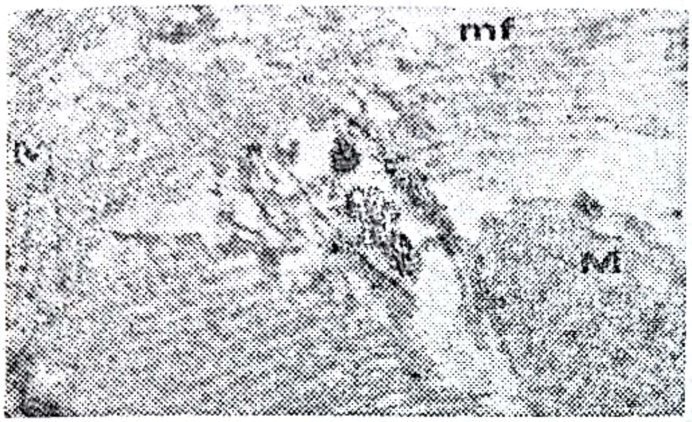


Fig. 8.65. — Acumularea Ca^{2+} într-o cisternă a reticulului sarcoplasmic dintr-un miocardocit ventricular pus în evidență prin precipitare cu oxalat. Depozitele electronoopace sînt oxalat de calciu (preparat necontrastat). *M* — mitocondrii; *mf* — miofilamente.

Acest proces nu necesită consum de energie, Ca^{2+} în spațiul extracelular fiind de 10 000 ori mai mult (10^{-3}M) decît intracelular (10^{-7}M) iar intrarea sa făcîndu-se în sensul gradientului electrochimic. Blocanții canalelor de Ca^{2+}, o clasă de antiaritmice (și vasodilatatoare) recent introduse în terapeutică (Verapamil, Diltiazem, Nifedipină), ar acționa fie blocînd orificiul extracelular al canalului (Verapamil, Diltiazem), fie, datorită caracterului hidrofob al moleculei lor, ar interacționa cu lipidele care înconjură canalul sau/și cu porțiunile hidrofobe ale proteinei însăși a canalului, deprimîndu-i funcția.

Cantitatea de Ca^{2+} care pătrunde în celulă în timpul PA este foarte mică, insuficientă pentru a iniția contracția. Această fracțiune de Ca^{2+} are rolul de a produce eliberarea unei cantități de Ca^{2+} mult mai mari din RS, unde acest ion se află stocat. Astfel, RS furnizează proporția cea mai mare din calciul necesar legării de troponină, permițînd interacțiunea miozină-actină, respectiv contracția.

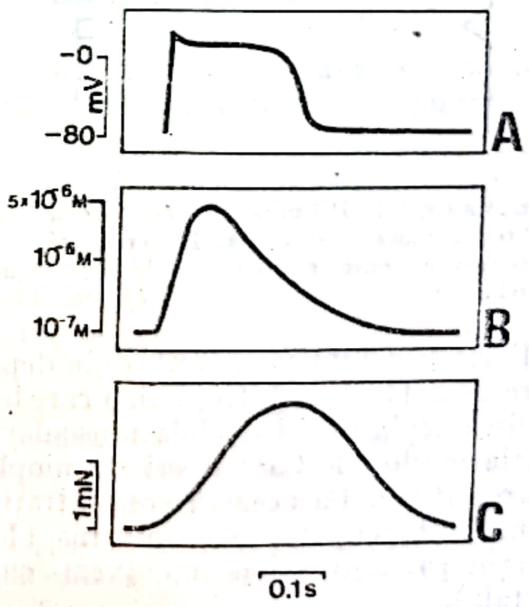


Fig. 8.66. Relația cronologică între potențialul de acțiune (*A*), concentrația citosolică a Ca^{2+} (*B*) și contracția (*C*) miocardocitelor ventriculare lucrătoare din mușchiul papilar (*mN* — milinewton).

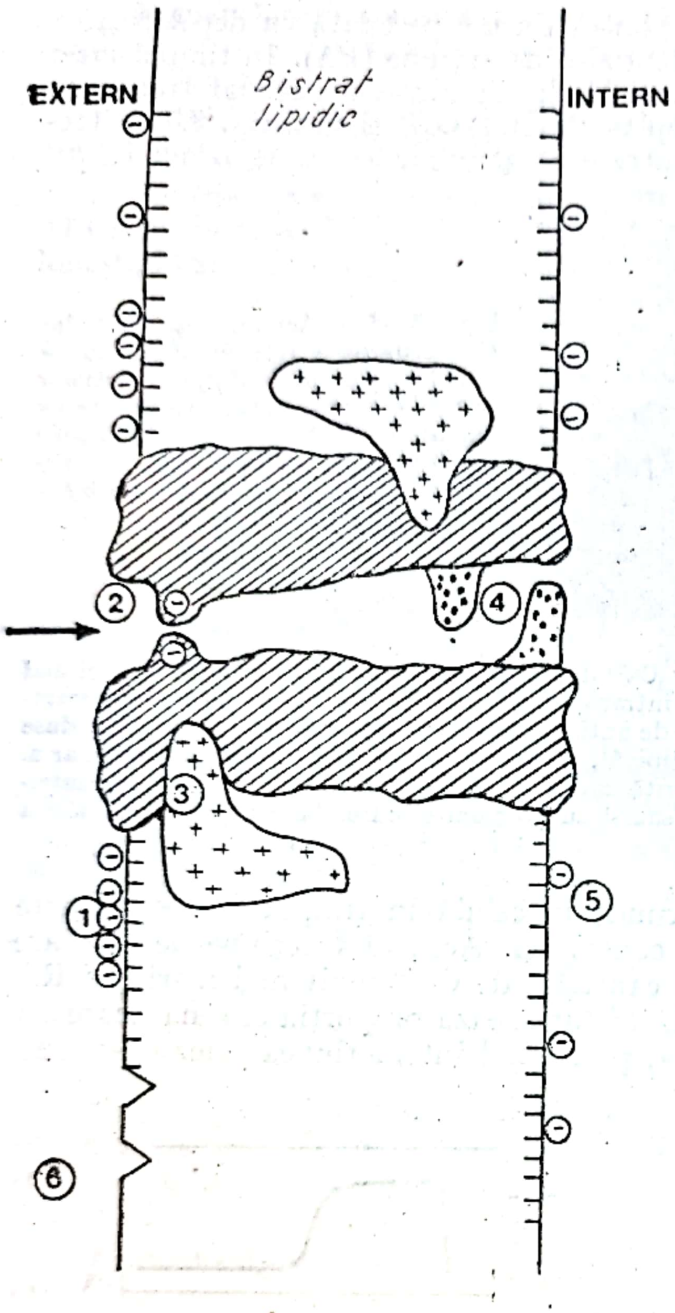


Fig. 8. 67. — Reprezentarea schematică a modelului ipotetic al canalului pentru Ca^{2+} din plasmalemă. Pe fața externă *(1)* și internă *(5)* a membranei se află locusuri încărcate negativ unde se leagă cationii. Canalul este figurat ca un por membranar, conținînd în interiorul lui un locus încărcat electronegativ *(2)* care are dimensiunile și sarcina adecvate pentru a putea funcționa ca „filtru de selectivitate", deosebind astfel diferiții cationi între ei și permițînd, în condiții fiziologice, doar accesul Ca^{2+}. Sînt figurați de asemenea, senzorii pentru diferențele de potențial *(3)* de care depinde (care comandă) deschiderea și închiderea canalului și porțile canalului *(4)* care deschid sau închid efectiv canalul. Locusul pentru receptor *(6)* intervine și el în modularea funcționării canalului. Canalele pentru Ca^{2+}, a căror funcționare depinde de diferențele de potențial, sînt denumite canale „operate" electric iar cele a căror funcționare depinde de diverși receptori (de exemplu adrenoreceptori) sînt denumite canale „operate" de receptori.

Concentrația Ca^{2+} în RS miocardic este probabil 10^{-3}M și, ca atare, mult mai mare decît în citosolul fibrei cardiace în diastolă. Trecerea Ca^{2+} cu funcție activatorie a contracției din RS în citosol se face în sensul gradientului de concentrație, pasiv, prin canalele pentru Ca^{2+} ale membranei RS.

Forța generată prin contracție depinde de numărul locusurilor activate, pe care le deblochează troponina care leagă calciul, în funcție de cantitatea Ca^{2+} din mioplasmă. În celula musculară cardiacă relaxată, în diastolă, concentrația ionilor de Ca^{2+} liberi în mioplasmă a fost estimată la 2×10^{-7} M (Fozzard, 1981). La această concentrație locurile de legare a Ca^{2+} de troponină nu sînt ocupate, tropomiozina blocînd situsurile unde poate avea loc interacțiunea miozină-actină (vezi cuplarea excitație-contracție în fibra scheletală).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 8. XV

Caracteristicile mecanismelor de transport al Ca^{2+} în miocardocite (după E. Carafoli și Penniston, 1985)

Mecanismul		Suprafața		K_M (μM)	Celula în repaus	Celula în contracție	
Localizare	Tipul	m^2/g țesut	Procente din total		Ca^{2+} transportat la concentrația de 0,1 μM procente din total	Ca^{2+} transportat la concentrația de 1 μM (10^{-6}M) procente din total	10 μM (10^{-5}M) procente din total
Sarcolemă	ATP-aza pentru Ca^{2+}	0,1	0,8	0,4	3,6	0,2	0,07
	Schimbul Na^+/Ca^{2+}			10*	27	3	1,9
Reticul sarcoplasmic	ATP-aza pentru Ca^{2+}	1,5	12,1	1	69	90	47
Mitocondrie (membrana internă)	Electroforetic prin cărăuș (canal)	10,6	87	10—20	0	6,4	51

* Cf. Lamers, 1985.

Concentrația-prag la care Ca^{2+} începe să fie legat de troponină este de 10^{-7} M; la 10^{-5} M toate locurile de legare ale Ca^{2+} de pe troponină sînt ocupate de ioni, concomitent atingîndu-se maximul forței de contracție (vezi fig. 8.66).

Relaxarea fibrei miocardice se produce după încetarea curentului lent de intrare a calciului și efluxului Ca^{2+} din RS. Astfel, oprirea mecanismelor care cresc concentrația Ca^{2+} citosolic le lasă operante doar pe cele care scad concentrația citosolică a Ca^{2+}.

Scăderea concentrației Ca^{2+} citosolic produce deplasarea ionului de pe troponină, aceasta reluîndu-și locul în mașinăria contractilă, punțile transversale se desfac, fibra se relaxează.

Activarea mecanismelor de eliminare a Ca^{2+} se face treptat în funcție de K_M^* pentru Ca^{2+} a fiecărui mecanism **.

Mecanismele care scad Ca^{2+} citosolic sînt localizate la nivelul sarcolemei, al membranei reticulului sarcoplasmic și mitocondriilor (tabelul 8.XV).

Sarcolema conține o pompă de eliminare a Ca^{2+} (ATP-ază pentru Ca^{2+}) și schimbătorul Na^+/Ca^{2+} (fig. 8.68).

* K_M — constanta Michaelis-Menten reprezintă concentrația substratului specific la care o enzimă dată are 50% din viteza maximă cu care își desfășoară activitatea față de substrat. K_M definește afinitatea enzimei pentru substrat: cu cît valoarea sa e mai mică, cu atît enzima are o afinitate mai mare pentru substrat și invers.

** Aceste mecanisme încep să funcționeze cînd cele prin care ionii de Ca^{2+} intră în citosol sînt încă active. Separarea influxului de efluxul calciului din citosol este făcută în mod curent din motive didactice.

Scanned with OKEN Scanner

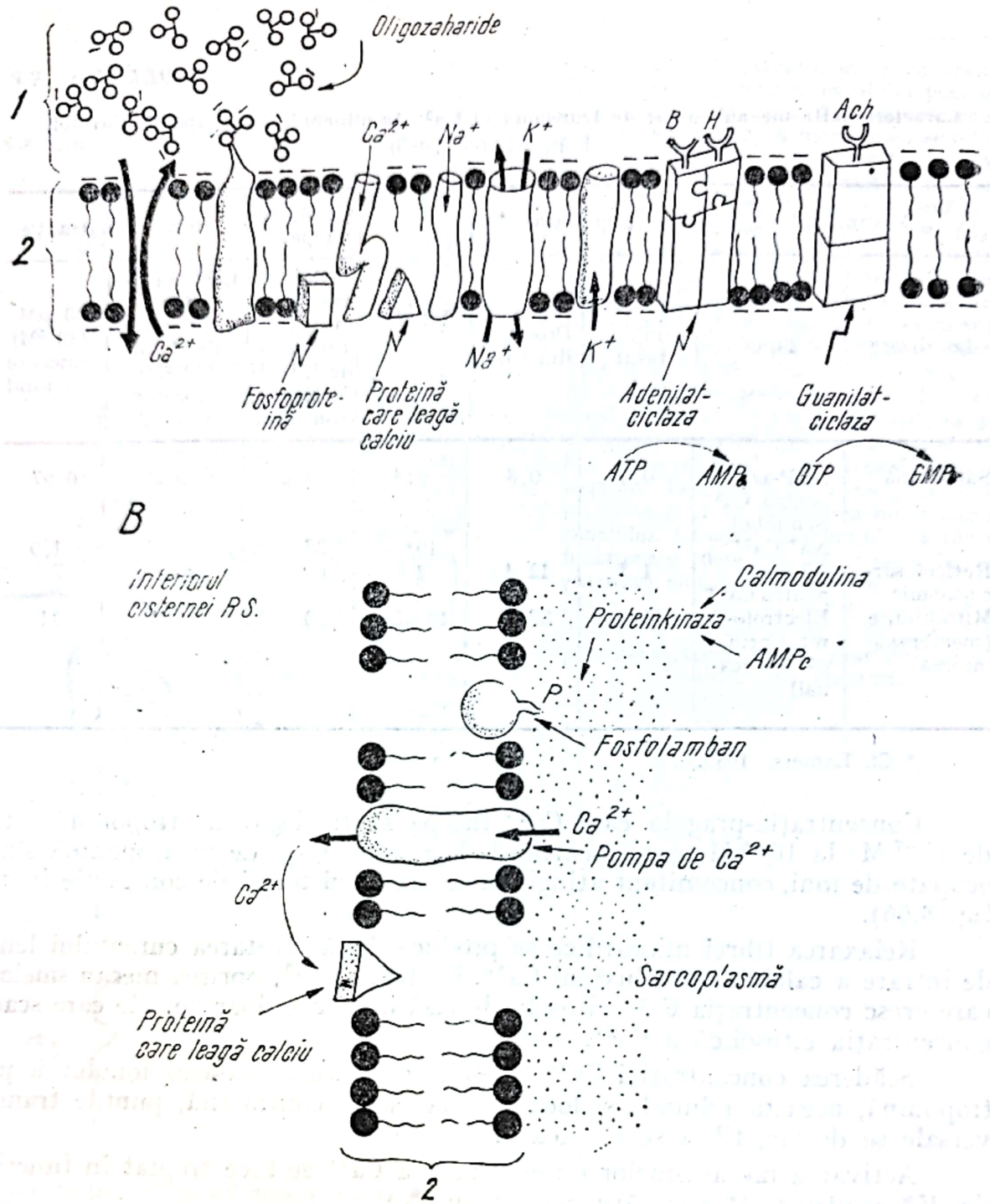


Fig. 8. 68. — Schema organizării moleculare a sarcolemei și membranei reticulului sarcoplasmatic din miocardocitul ventricular. Ambele membrane sînt formate dintr-un bistrat lipidic *(2)* în care se găsesc înglobate proteine care funcționează ca sisteme transportoare sau canale pentru cationi. *A* — sarcolema. Suprafața externă a sarcolemei este acoperită de glicocalix încărcat electronegativ *(1)*. Sînt figurați, alături de sistemele transportoare și canalele ionice, receptorii pentru neurotransmițători (β-receptor β-adrenergic, *Ach* — receptor pentru acetilcolină) și hormoni *(H)*, împreună cu enzimele generatoare de nucleotide ciclice. Legarea agoniștilor de receptori este tradusă intracelular prin modificarea concentrației nucleotidelor ciclice, rezultînd din activarea enzimelor care le generează prin interacțiunea acestora cu receptorii care au legat agoniștii. *B* — membrana reticulului sarcoplasmic. Proteinele majore conținute în această membrană sînt: pompa pentru Ca^{2+}, proteinele care legînd Ca^{2+} îl stochează (calsechestrina) și fosfolambanul, proteină cu funcție reglatorie, care, fosforilată de proteinkinază (activată de AMPc sau calmodulină), modulează activitatea pompei pentru Ca^{2+} a reticulului producînd creșterea transportului Ca^{2+} în lumenul *RS*.

Scanned with OKEN Scanner

Pompa sarcolemală de eliminare a Ca^{2+} este o proteină integrală; funcționarea ei este reglată de calmodulină și prin cicluri de fosforilare-defosforilare proteică, efectuate de proteinkinaze activabile prin AMPc sau calmodulină (fig. 8.69 și 8.70). Schimbul Na^+/Ca^{2+} este efectuat de un cărăuș, o glicoproteină integrală sarcolemală cu GM de aproximativ 82 000. El reprezintă cel mai important mecanism de eliminare a Ca^{2+} în afara celulei și constă în transportul în sens opus a trei ioni de Na^+ pentru un ion de Ca^{2+} eliminat. Schimbul este electrogenic, compensarea sarcinilor se face probabil prin mișcarea Cl^- odată cu Na^+ sau/și prin mișcarea K^+ în aceeași direcție cu Ca^{2+}. Sodiul este eliminat din celulă prin pompa sarcolemală a Na^+ (ATP-aza Na^+-K^+).

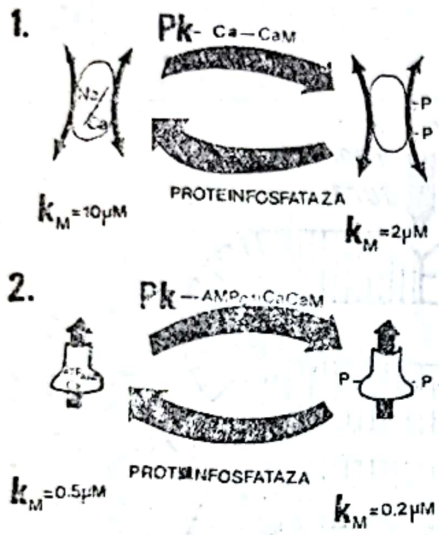


Fig. 8.69. — Comparație între reglarea activității cărăușului Na^+/Ca^{2+} *(1)* și a pompei pentru Ca^{2+} *(2)* din sarcolema cardiacă, prin procese de fosforilare și defosforilare a proteinelor care-i compun (Lamers, 1985). K_M — afinitatea pentru Ca^{2+}; Pk-Ca-*CaM* — proteinkinaza activată de calciu-calmodulină; *Pk-AMPc* și *CaCaM* — proteinkinaza activată de AMP ciclic și calciu-calmodulină.

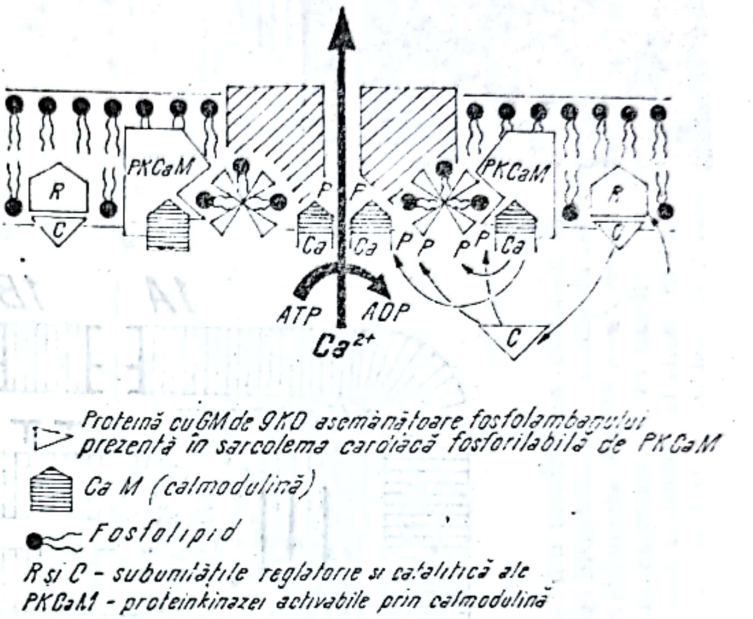


Fig. 8.70. — Schema reglării pompei pentru Ca^{2+} (*ATP*-aza pentru Ca^{2+}) din plasmalema miocardocitului lucrător (după Lamers, 1985).

În membrana RS se găsește o pompă (ATP-ază) pentru Ca^{2+} prin care ionul este preluat din citosol și depozitat în cisternele reticulului.

Captarea Ca^{2+} este un proces activ, aproximativ 20% din ATP-ul produs în miocardocitul lucrător este consumat în acest proces. AMPc reglează transportul Ca^{2+} prin membrana RS, proteinkinaza AMPc-dependentă, fosforilează o proteină de 22 kD, denumită fosfolamban, care, în stare fosforilată, activează pompa pentru Ca^{2+} din membrana RS, accelerînd intrarea Ca^{2+} în cisternele reticulului (vezi fig. 8.68).

Mitocondriile au proprietatea de a elibera (fig. 8.71) ionii de Ca^{2+}. Ele pot capta Ca^{2+} în cantități mari și au rolul de a tampona creșterile mari ale Ca^{2+} citosolic (fig. 8.72 și 8.73). Mecanismul de captare a Ca^{2+} în mitocondrii intervine atunci cînd celelalte mecanisme de scădere ale Ca^{2+} citosolic (sarcolemal, RS) sînt saturate și depășite (vezi tabelul 8.XV). Recent,

Scanned with OKEN Scanner

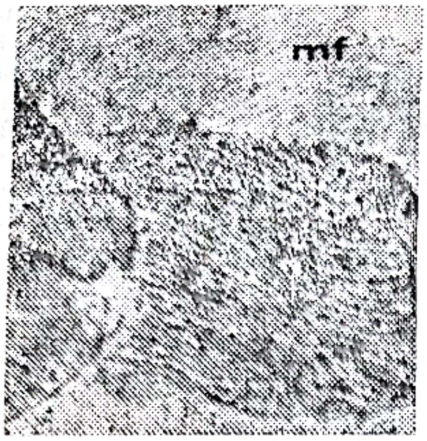


Fig. 8. 71. — Evidențierea acumulării Ca^{2+} în mitocondriile cardiace (ventriculare) prin precipitare cu oxalat. Depozitele electronoopace sînt oxalat de calciu (preparat necontrastat); *mf* — miofilamente (după I. Diculescu și colab., 1971).

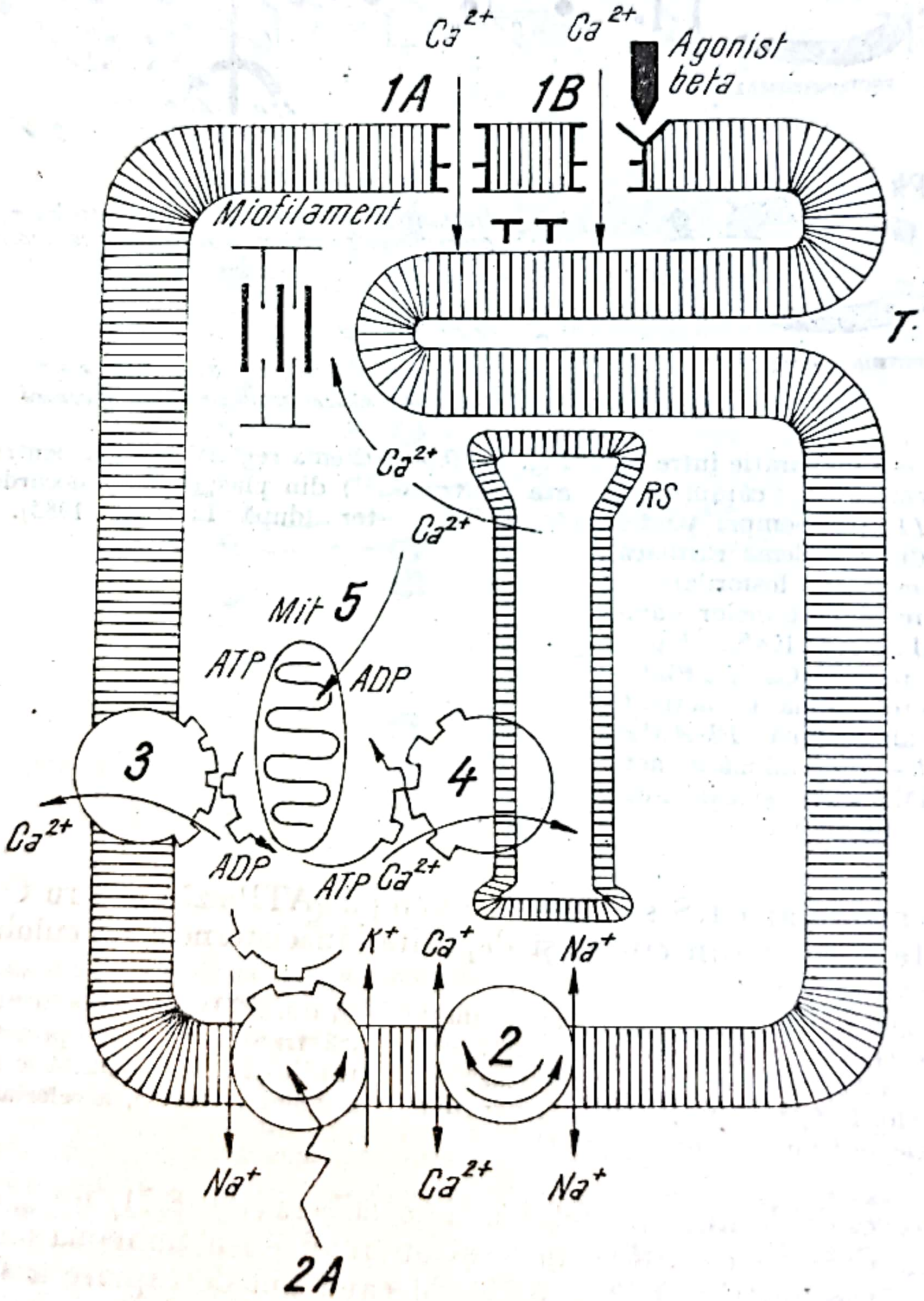


Fig. 8. 72. — Schema mecanismelor de homeostazare a Ca^{2+} în miocardocitul lucrător (Braunwald, 1983).

Scanned with OKEN Scanner

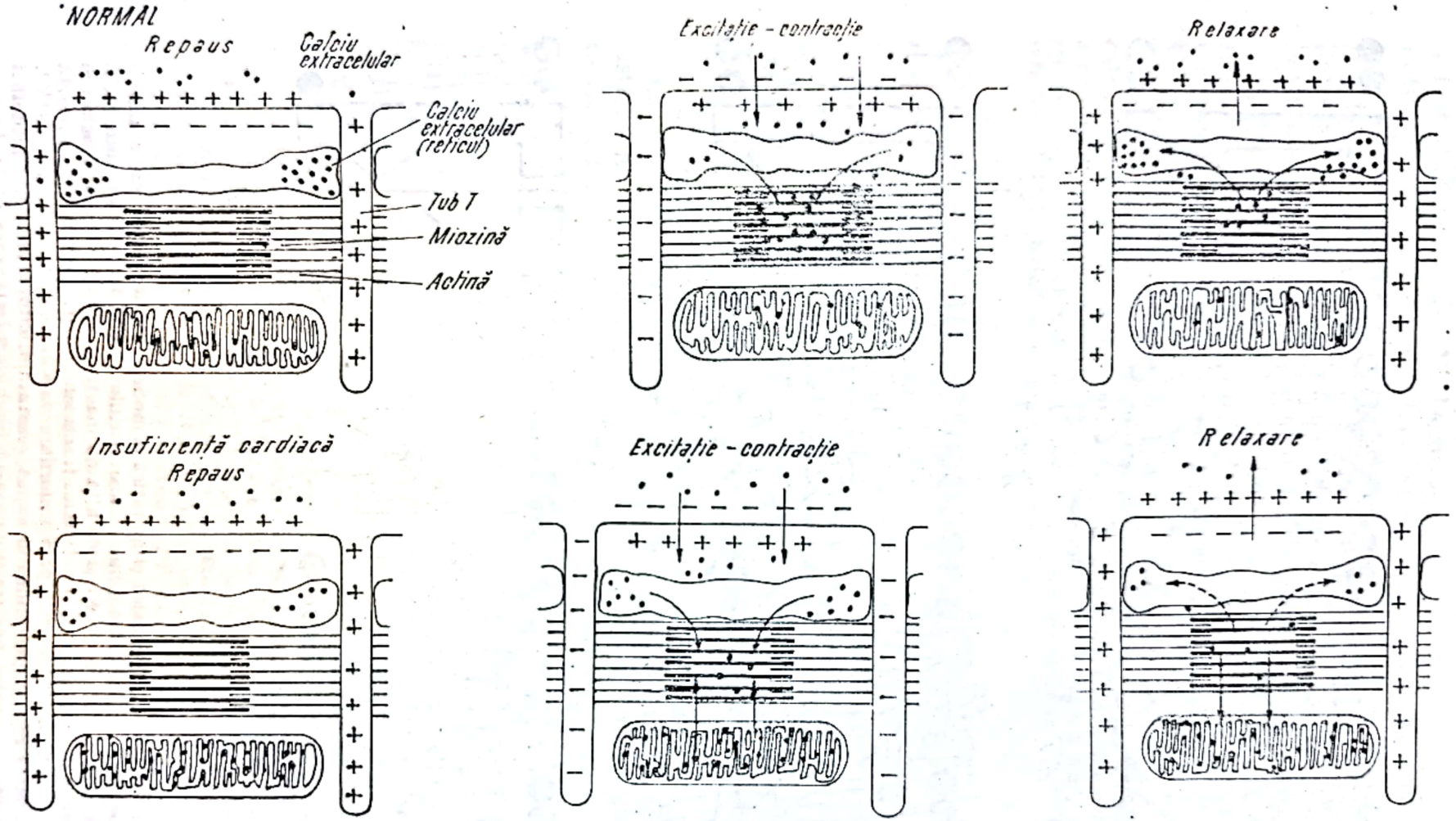


Fig. 8.73. — Anomalia ipotetică în cuplarea excitației cu contracția din insuficiența cardiacă (schemă). În fibra cardiacă normală, în repaus, Ca^{2+} extracelular se găsește lîngă sarcolemă și în sistemul T, cel intracelular, în special în reticulul sarcoplasmatic. O dată cu depolarizarea intră în celulă o cantitate de Ca^{2+} care produce contracția prin eliberarea din *RS* a calciului activator pentru aparatul contractil. În timpul fazei de relaxare, Ca^{2+} este receptat de RS și eliminat în spațiul extracelular. În insuficiența cardiacă, insuficiența reticulului în a depozita și elibera Ca^{2+} face din mitocondrii principalul compartiment al stocării și eliberării Ca^{2+}. Deși mitocondriile depozitează importante cantități de Ca^{2+}, eliberarea sa în cursul depolarizării se face lent și insuficient cantitativ pentru o contracție eficientă.

Scanned with OKEN Scanner

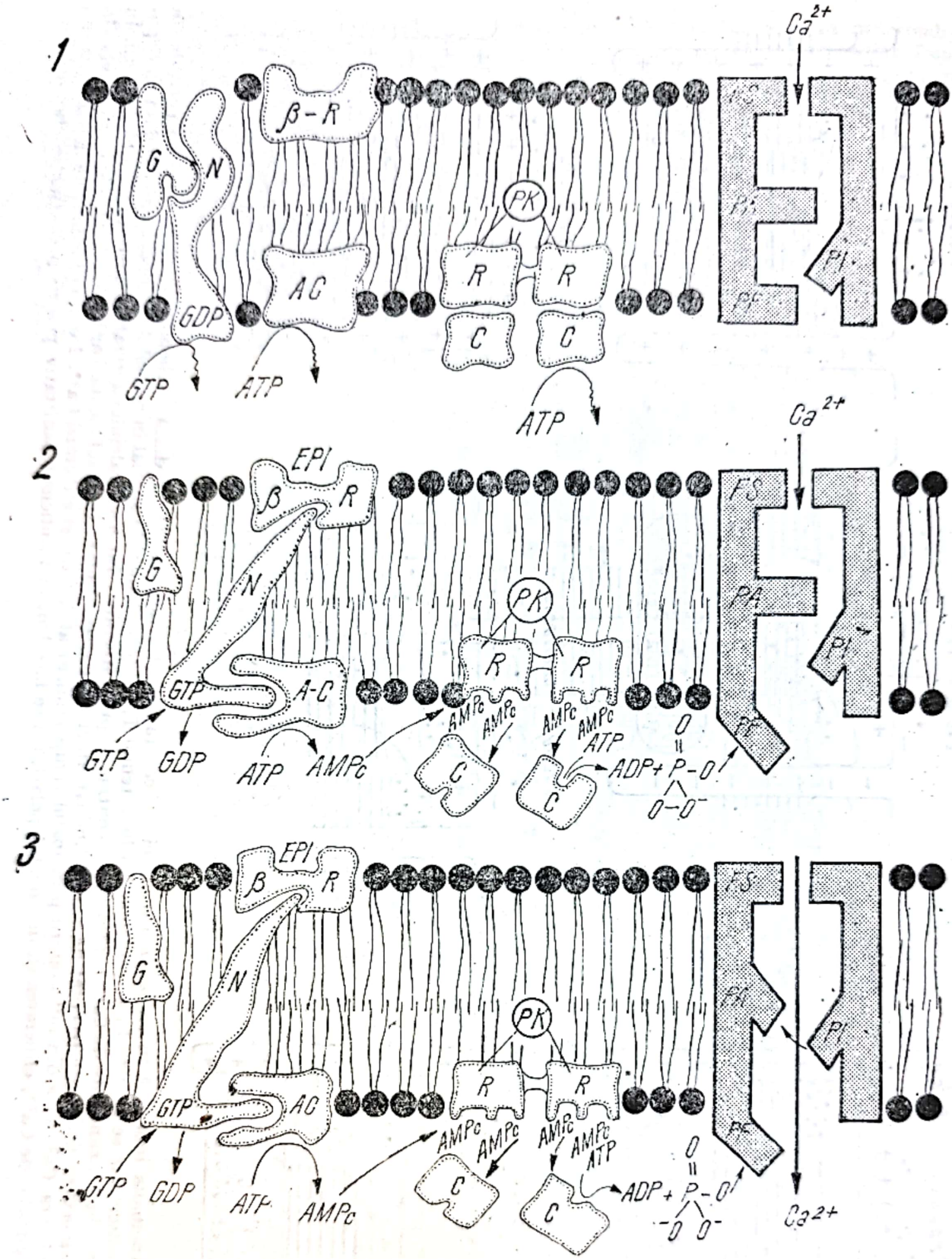


Fig. 8.74. — Reprezentarea schematică și ipotetică a modulării prin β-receptor a activității canalului pentru Ca^+ din sarcolema miocardocitului. Activitatea canalului ar fi reglată de o poartă de activare *(PA)* și de alta de inactivare *(PI)*, care se deschid și se închid ca răspuns la modificările potențialului transmembranar, precum și de o poartă *(PF)* activabilă (se deschide) numai prin fosforilare de către o proteinkinază *(PK)*. Această ultimă poartă reprezintă domeniul expus versantului citoplasmatic al proteinei care constituie canalul. Canalul mai are și un așa-zis filtru de selectivitate *(FS)*. În condițiile potențialului de repaus (*1*), *PA* este închisă iar *PI* deschisă. *PF* este și ea închisă,

Scanned with OKEN Scanner

a fost demonstrat (R. M. Denton, 1980, 1985) că atunci cînd în matricea mitocondrială concentrația Ca^{2+} atinge valoarea de 10^{-6} M (1 μM), este activat ciclul Krebs, prin activarea de către Ca^{2+} a piruvat-DH, izocitrat-DH și alfa-cetoglutarat-DH. Se produce astfel o cantitate mai mare de ATP, necesar în aceste condiții în cantități crescute pentru susținerea celorlalte mecanisme de eliminare a Ca^{2+} (ATP-aza din sarcolemă, RS).

Eliberarea Ca^{2+} mitocondrial și glicozidele cardiace. Mitocondriile pot elibera Ca^{2+} stocat prin mai multe mecanisme. Unul din ele este de interes aparte, și anume eliberarea Ca^{2+} prin schimb cu Na^+ din citosol, stoichiometria schimbului fiind doi ioni Na^+ pentru un ion Ca^{2+}. Acest mecanism are specificitate de țesut, fiind prezent doar în mitocondriile din miocard, creier, cortexul suprarenalian și nu în ficat, plămîn, rinichi (țesuturi neexcitabile). Prezența schimbului Na^+: Ca^{2+} mitocondrial în miocardocit ar putea constitui una din explicațiile acțiunii inotrop-pozitive a glicozidelor cardiace. Acestea, crescînd concentrația citosolică a Na^+, ca urmare a inhibării pompei Na^+-K^+ sarcolemale, realizează condiții pentru eliberarea Ca^{2+} din mitocondrii, Ca^{2+} rezultat adițional avînd efect inotrop-pozitiv.

În concluzie, esența procesului cuplării excitației cu contracția în miocardocit constă în mișcările ciclice ale ionilor Ca^{2+}. Caracterul repetitiv este realizat prin succesiunea depolarizărilor sarcolemale, datorată automatismului intrinsec, care declanșează și condiționează contracția, urmate de repolarizări, în care fibra se relaxează.

Reglarea cineticii Ca^{2+} în miocardocitele lucrătoare

Modularea contractilității se efectuează prin intermediul mecanismelor beta-adrenergice care au ca țintă mișcările intracelulare ale Ca^{2+} și procesele de fosforilare proteică (vezi fig. 8.69, 8.70, 8.74).

Plasmalema miocardocitului conține ansambluri de proteine integrale avînd funcții diverse și care reprezintă ținta unor mecanisme reglatorii. Astfel sînt descrise: canale ionice pentru Na^+, K^+, Ca^{2+}; conexoni ce conțin canale cu permeabilitate pentru diverse molecule, permeabilitatea lor fiind reglabilă; schimbători ionici: Na^+/Ca^{2+}; cărăuș: pentru glucoză; pompe ionice (ATP-aze) pentru Na^+-K^+, $Ca^{2+}-Mg^{++}$; receptori specifici pentru: catecolamine (adrenoreceptori, acetilcolină, hormoni (vezi fig. 8.68).

Mai multe mecanisme au fost propuse pentru a explica efectele diferiților agenți fiziologici sau farmacologici. Cele mai bine înțelese sînt cele care antrenează creșterea AMPc intracelular prin activarea adrenoreceptorilor, AMPc activînd proteinkinaza specifică lui, care la rîndul ei, fosforilează diferite proteine (pompe, canale. etc.) din sarcolemă, citosol și/sau membrana

---

nefiind activată (fosforilată). Ca urmare a legării epinefrinei de β-receptor [β−*R*(2)], se produc modificări conformaționale în aceasta, care permit interacțiunea sa cu proteina reglatorie a adenilatciclazei *(AC)*; cele două subunități disociază, ca urmare a înlocuirii *GDP*-ului cu *GTP* în subunitatea *N* care se leagă de *AC*, o activează și se produce *AMPc*. AMPc se leagă de subunitățile -R- ale *PK*, ca urmare fiind puse în libertate subunitățile catalitice -*C*; acestea din urmă fosforilează *PF*, care se deschide. În această situație prin canal nu trec ioni de Ca^{2+}, nu există curent de calciu, *PA* fiind închisă. La o depolarizare a membranei *(3)* dincolo de potențialul de prag, *PA* se deschide și *PI* începe să se închidă, dar foarte lent. În acest moment, canalul este complet deschis, se înregistrează curentul de calciu, creat de scurgerea ionilor de Ca^{2+} spre interiorul celulei, în sensul gradientului lor electrochimic. După un timp, *PI* se închide, trecerea ionilor de Ca^{2+} prin canal încetează. Odată cu reîntoarcerea la potențialul de repaus, în diastolă, *PA* se închide iar *PI* se deschide lent, procesul fiind denumit reactivarea canalului, ajungîndu-se în situația *1* din schemă și ciclul se reia.

Scanned with OKEN Scanner

RS. Proteinfosfatazele, defosforilînd proteinele, inactivează procesele celulare pe care acestea le mediază (vezi fig. 8.69, 8.70, 8.74).

Catecolaminele influențează proprietățile contractile și electrice ale miocardocitelor prin receptorii beta-adrenergici sarcolemali. Ei sînt în miocardocitele ventriculare aproape exclusiv de tip $beta_1$. Recent a fost menționată și prezența alfa-receptorilor (probabil $alfa_1$), stimularea lor crescînd inotropismul prin activarea într-o manieră necunoscută a influxului Ca^{2+} în celulă. Figura 8.74 prezintă schema conceptului actual al reglării prin beta-receptori a canalului pentru Ca^{2+}.

Recent, s-a arătat că miocardocitele umane provenite de la pacienți cu insuficiență cardiacă severă (care au suferit transplant cardiac) au un număr scăzut al beta-receptorilor care ar putea explica astfel scăderea contractilității.

Efectele inotrop-negative ale acetilcolinei sînt mediate prin receptorul sarcolemal al acesteia, a cărui stimulare ar crește concentrația intracelulară a GMPc și care ar asocia o diminuare a curentului lent de intrare al Ca^{2+}.

Injectarea GMPc intracelular scade inotropismul și scurtează potențialul de acțiune al fibrei cardiace.

O componentă proteică a sarcolemei de un considerabil interes fiziologic și farmacologic este pompa $Na^+—K^+$. Activarea ei explică menținerea gradientului electrochimic primar (între Na^+ și K^+ intra- și extracelular) atît în repaus cît și după trecerea undei de depolarizare (care reprezintă baza excitabilității), fiind în același timp ținta moleculară a glicozizilor digitalici cu efect tonicardiac.

Enzima constă dintr-o subunitate catalitică mare (110 kD), notată alfa, și o subunitate glicoproteică mai mică (55 kD), beta. Legarea ATP-ului se face la domeniul intracelular iar legarea glicozizilor — la un locus extracelular, ambele situate la nivelul subunității catalitice alfa. Subunitatea alfa constă din 1016 aminoacizi avînd 8 domenii transmembranare hidrofobe, notate convențional $H_1—H_8$. Domeniul H_1 și H_2 formează probabil canalul pentru cationi. Subunitatea alfa poate avea cel puțin două stări conformaționale moleculare, Na^+ și K^+ traversînd membrana în timpul tranzițiilor între aceste stări. Similitudini ale structurii moleculare și mecanismului enzimatic între ATP-aza $Na^+—K^+$, ATP-aza pentru Ca^{2+} și alte ATP-aze, la eucariote îndepărtate filogenetic, sugerează că ele au evoluat dintr-un strămoș comun. A. Schwartz și colab. (1985) au precizat structura primară și corelațiile structură—funcție ale subunității alfa care au fost prezentate rezumativ mai sus.

Creșterea inotropismului miocardocitelor lucrătoare ca urmare a blocării activității pompei $Na^+—K^+$ prin glicozizi digitalici, rămasă neclară multă vreme, a primit recent o explicație: suportul său ar fi creșterea amplitudinii fluxurilor intracelulare ale Ca^+ în cursul potențialului de acțiune.

Rămîne să fie stabilită cu certitudine originea surplusului de Ca^{2+} și dinamica ionului între diferitele compartimente intracelulare ale acestuia, în condițiile prezenței glicozizilor tonicardiaci.

Modificarea cineticii Ca^{2+} (a fluxurilor între diferitele compartimente intracelulare și între celulă și spațiul extracelular) în miocardocit reprezintă calea finală prin care factorii reglatori influențează contractilitatea acestuia. În figura 8.72 este prezentată schema compartimentalizării și mecanismelor prin care este controlată dinamica și, implicit, concentrația Ca^{2+} în fibra musculară lucrătoare. Sînt cunoscute următoarele mecanisme de control al cineticii Ca^{2+} în miocardocit:

— influxul Ca^{2+} se face în sensul gradientului de concentrație prin canale operate electric (1 A), creînd curentul lent de intrare a Ca^{2+} în cursul potențialului de acțiune (sau/și canale operate de receptori — 1 B);

Scanned with OKEN Scanner

— schimbătorul Na^+/Ca^{2+} sarcolemal. Direcția schimbului depinde de concentrațiile Na^+ și Ca^{2+} intra- și extracelular. Astfel, inhibarea pompei sarcolemale pentru Na^+/K^- (2A) prin glicozizi tonicardiaci duce la creșterea concentrației intracelulare a Na^+, intensitatea schimbului Na^+/Ca^{2+} scade, Ca^{2+} rămînînd mai mult intracelular și avînd efect inotrop-pozitiv;

— pompa sarcolemală de extruzie a Ca^+ (ATP-aza pentru Ca^{2+});

— pompa pentru Ca^{2+} din membrana RS, ATP-ază care transportă ionul din citosol în lumenul reticulului;

— Ca^{2+} poate fi captat și eliberat de mitocondrii; Ca^{2+} acumulat în mitocondrii interferează cu funcția lor, decuplînd fosforilarea oxidativă și scăzînd producerea ATP-ului, așa cum se întîmplă în insuficiența cardiacă (vezi fig. 8.73 și 8.75);

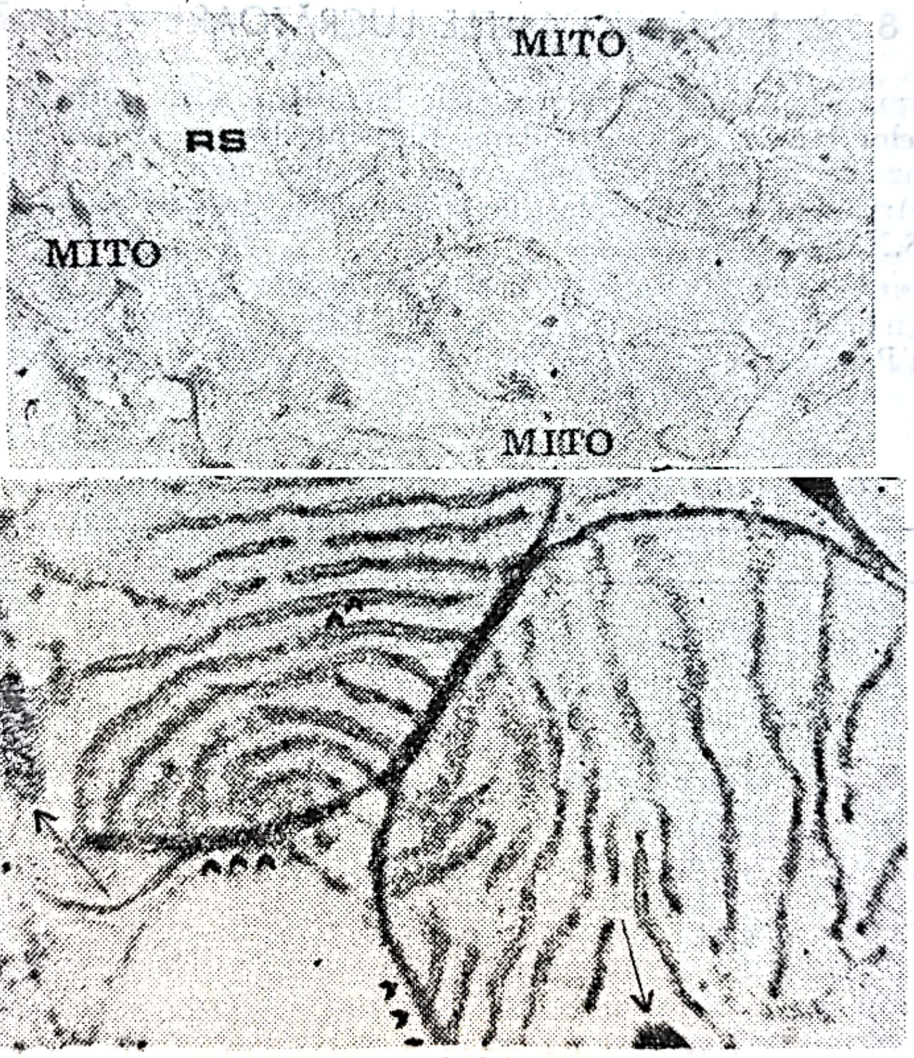


Fig. 8.75. — A — Imobilizarea patologică a calciului în mitocondriile și reticulul sarcoplasmatic din miocardocite în insuficiența cardiacă. Depozitele electronoopace sînt lipoproteine (provenind din membranele alterate de procesul patologic) care au legat Ca^{2+} în depozitele electronoopace, fapt demonstrat prin microscopie electronică analitică cu raze X. Depozitele patologice pot ocupa în mitocondrii pînă la 5% din volumul mitocondrial. *MITO* — mitocondrie; *RS*— reticul sarcoplasmic (după I. Diculescu și colab., 1978). *B* —Mitocondriile (detaliu din figura 8.75 A) conțin două feluri de depozite patologice: unele fine, localizate la nivelul membranelor cristale (capete de săgeți) și altele mari, în matricea mitocondrială (săgeți).

Scanned with OKEN Scanner

— proteine intracelulare ca troponina C și calmodulina, care, avînd proprietatea de a lega Ca^{2+}, tamponează și reglează concentrația acestuia în mioplasmă.

Afectarea oricăruia din mecanismele menționate mai sus poate modifica performanțele contractile ale miocardului lucrător.

În insuficiența cardiacă, atît experimentală cît și la indivizii umani, s-a constatat perturbarea homeostaziei intracelulare a Ca^{2+} atît în ceea ce privește modificarea distribuției ionului între diferitele compartimente cît și limitarea cantității Ca^{2+} disponibil mașinăriei contractile (reducerea captării și a eliberării Ca^{2+} din RS, creșterea depozitelor sale în mitocondrii, unde este imobilizat) (vezi fig. 8.73 și 8.75). Natura mecanismului perturbat pare să varieze în funcție de etiologia insuficienței cardiace.

8.3.2. MIOCARDOCITELE LUCRĂTOARE ATRIALE

Forma și mărimea fibrelor atriale lucrătoare sînt comparabile cu cele ale celulelor lucrătoare ventriculare. Ele sînt dispuse în fascicule care se anastomozează între ele. Ultrastructura fibrelor atriale este similară cu a celor ventriculare, avînd în plus, față de acestea, granule secretorii specifice (tabelul 8.XVI).

Granulele atriale și factorul natriuretic atrial (FNA)

Granulele semnalate prima oară de Palade (1961) și descrise de Jamieson și Palade (1964) au formă sferică, cu diametrul de aproximativ 500 nm

TABELUL 8. XVI

Caracteristici morfofuncționale ale unor tipuri de miocardocite

Tipul celular	Celule P	Celule Purkinje	Miocardocite lucrătoare	
Localizare	Nod SA Nod AV	Tracturi internodale Fasciculul His și ramurile sale, rețeaua Purkinje	Atriale	Ventriculare
Funcție	Generarea (impulsului (celule *pacemaker*)	Propagarea impulsului	Contracție	Contracție
Viteza de conducere a impulsului	0,2 m/s	5m/s	1 m/s	0,5 m/s
Grosime	5 μm	20—25 μm	15 μm	15 μm
Tubii T	—	—	+	+
			Prezența lor încetinește viteza de conducere a PA	
Miofilamente	± (dezordonate)	+ (subsarcolemale)	+++	+++
Mitocondrii	Puține (rezistă la hipoxie)	+	+++	+++
Glicogen	±	+++	++	++
Joncțiuni intercelulare	Desmozomi (între ele) Disc intercalar (cu celule T)	Desmozomi și *gap*	Discuri intercalare	Discuri intercalare

Scanned with OKEN Scanner

avînd un conținut cu aspect omogen dar cu densități variate de la o granulă la alta. Granulele sînt localizate predominant în regiunea perinucleară, funcția lor nefiind cunoscută pînă de curînd, deși a fost presupusă ca funcție secretorie încă de Palade.

În 1981, un grup de cercetători canadieni (A. de Bold și alții) au arătat că granulele din fibrele musculare atriale ale mamiferelor conțin un factor natriuretic de natură polipeptidică, denumit factorul natriuretic atrial.

FNA produce diureză, natriureză și kaliureză masivă, scade tensiunea arterială, mai ales la subiecții hipertensivi, diminuînd secreția și nivelul plasmatic al reninei și aldosteronului. FNA este prezent în sîngele indivizilor normali, fiind cea mai puternică substanță natriuretică endogenă descrisă pînă acum (fig. 8.76).

Granulele atriale conțin molecula precursoare a FNA. La om, prohormonul are 151 de aminoacizi: primii 24, la capătul N-terminal, constituie peptidul hidrofob-semnal; ultimii 28, la capătul C-terminal, reprezintă peptidul activ. Prohormonul este glicozilat la aminoacizii 87—89, avînd și o legătură disulfidică intracatenară, între cisteinele 129 și 145, importantă pentru activitatea biologică. Datorită variatelor proceduri de izolare au fost obținute mai multe „peptide atriale". Molecula activă constă dintr-un lanț de 28 de aminoacizi, respectiv ultimii 28 (fig. 8.77). FNA duce la vasoconstricția arteriolei eferente, crește filtratul glomerular și diureza. FNA produce vasodilatație sistemică, antagonizînd vasoconstricția produsă în special de angiotensina II dar și de norepinefrină sau potasiu. FNA scade TA la oamenii cu hipertensiune arterială cu reninemie crescută. FNA scade debitul cardiac fără să aibă un efect inotrop-negativ. La nivelul fibrei musculare netede vasculare, FNA interacționează cu receptorii specifici, activează guanilatciclaza membranară și crește GMPc. Activarea pompei sarcolemale de extruzie a Ca^{2+} ar putea explica vasodilatația produsă de FNA (L. M. Popescu, 1985). Efectul vasoconstrictor al FNA asupra arteriolei eferente este explicat prin eliberarea unui agent vasoconstrictor endogen neprecizat.

8.3.3. MIOCARDOCITELE SISTEMULUI EXCITOCONDUCTOR

Miocardocitele sistemului excitoconductor sînt de trei tipuri: celulele P, T și Purkinje; se mai numesc și celulele nodale (vezi tabelul 8.XVI).

Celulele P au formă rotundă sau ovală, citoplasmă cu aspect clar și un nucleu, care, fiind situat în centrul celulei, apare, datorită acestui fapt, disproporționat de mare.

Sarcolema acestor celule are numeroase invaginări de origine probabil pinocitară, fiind lipsite de sistem T. Aparatul contractil este slab dezvoltat, miofibrilele sînt puține și dispuse fără o orientare ordonată, celulele P neavînd funcție contractilă. Mitocondriile sînt rare, au dimensiuni mici și criste puține, reticulul sarcoplasmatic fiind de asemenea foarte puțin dezvoltat.

Celulele P stabilesc joncțiuni de tip desmozomal numai între ele sau cu celulele T. Cu acestea din urmă stabilesc și joncțiuni de tip disc intercalar.

Se consideră că celulele P sînt celulele care au funcție de *pace-maker*.

Celulele T au formă alungită și structură și organizare celulară intermediară între celulele P și miocardocitele lucrătoare.

Sarcolema celulelor T este lipsită de sistemul T. Celulele T conțin mai multe miofibrile și mitocondrii decît celulele P.

Celulele T ar avea rolul a de răspîndi impulsul care își are originea în celulele P și de a opri accesul impulsurilor ectopice premature.

Celulele T stabilesc joncțiuni cu celulele P sau/și cu miocardocitele lucrătoare.

Scanned with OKEN Scanner

Celulele Purkinje sînt mai mari decît cele ale miocardului lucrător; la microscopul optic citoplasma apare clară observîndu-se de asemenea un inel de fibrile situate periferic, subsarcolemal. Sînt prezenți unul, arareori doi nuclei, dispuși central.

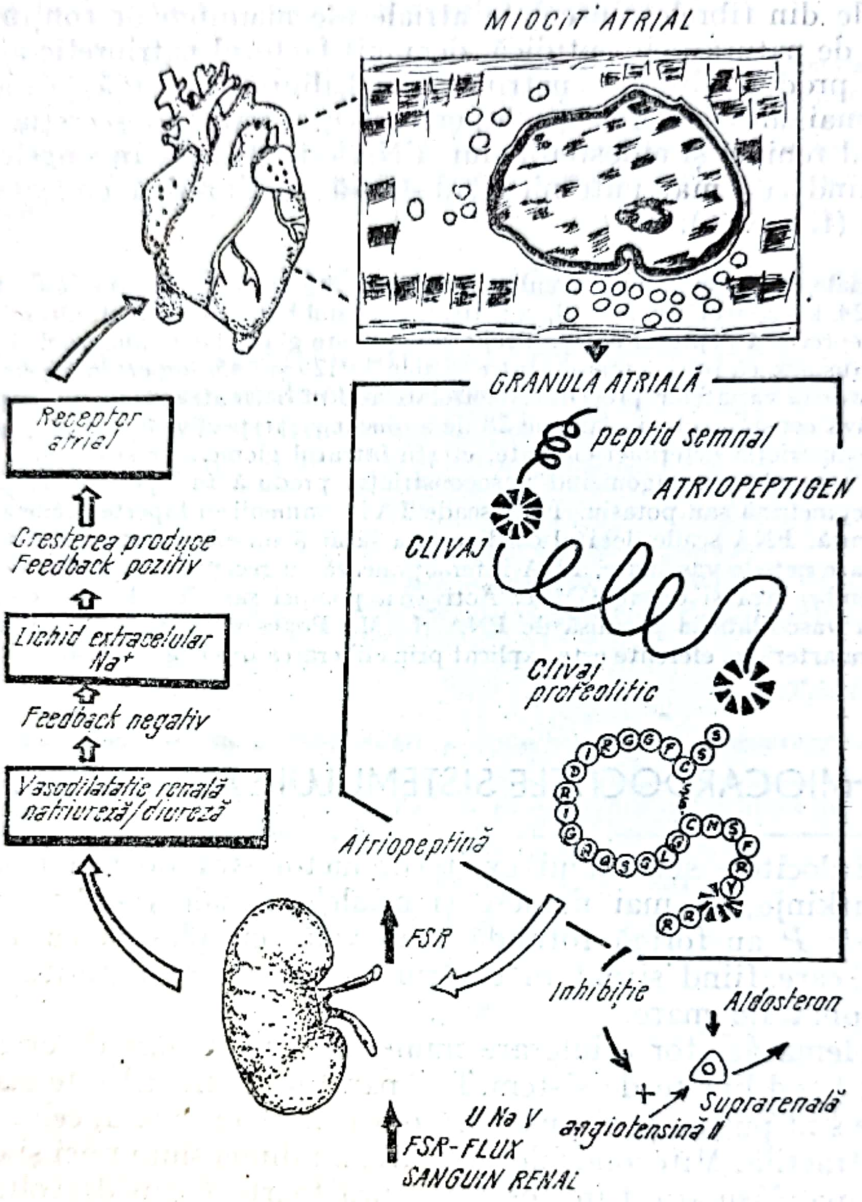


Fig. 8.76. — Diagrama prezintă schema producerii și acțiunilor factorului natriuretic atrial. Prin îndepărtarea polipeptidului-semnal (hidrofob) ia naștere molecula precursoare mare, denumită aici atriopeptigen. Peptidul activ biologic, localizat către capătul C-terminal al precursorului, este pus în libertate prin clivare proteolitică. Tensionarea (elongarea) miocardocitelor atriale în condițiile măririi volumului lichidului extracelular (retenții de Na^+) declanșează eliberarea peptidului activ în circulația sanguină. Organul-țintă primar este rinichiul, peptidul producînd creșterea filtratului glomerular și, consecutiv, diureză și natriureză. Circuitul funcțional menționat se întrerupe după terminarea acțiunii FNA, care produce scăderea concentrației Na^+ plasmatic și eliminarea apei; volumul extracelular se micșorează fiind eliminat astfel stimulul atrial, declanșator al secreției peptidului.

Scanned with OKEN Scanner

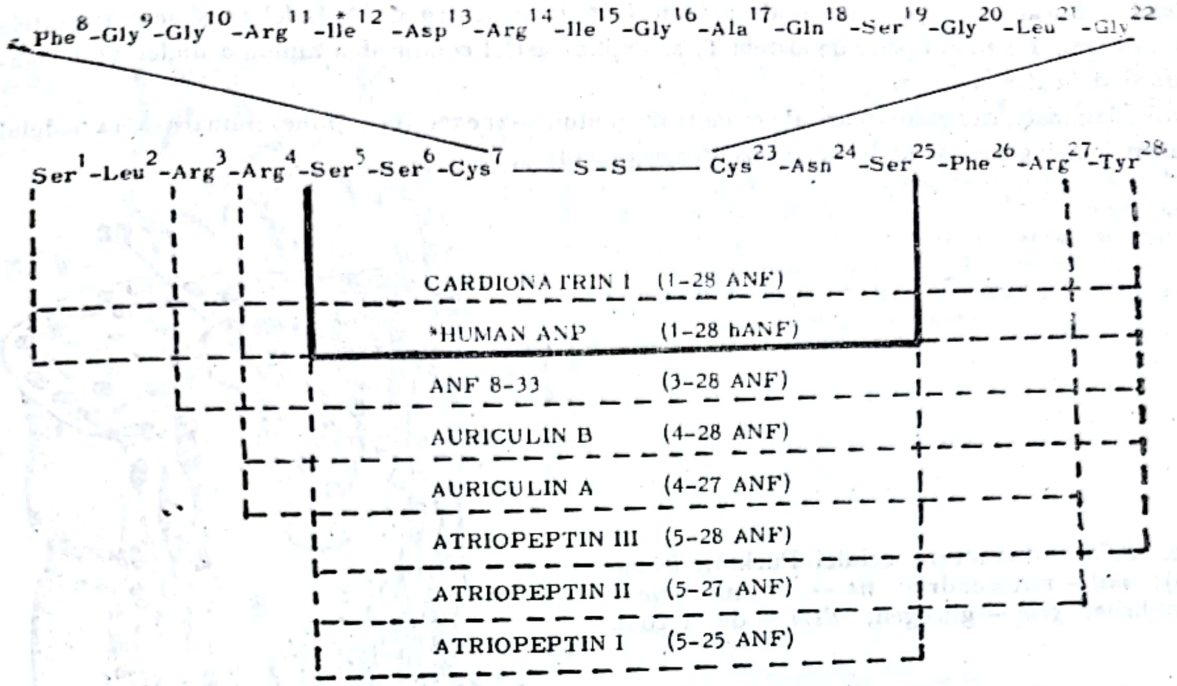


Fig. 8.77. — Schema prezintă structura diferitelor peptide atriale și denumirile acestora (așa cum sînt folosite în literatura de limbă engleză). Numerotarea ultimilor 28 de aminoacizi (ai capătului C-terminal al prohormonului) este arbitrară, numărul 1 fiind primul aminoacid N-terminal al polipeptidului activ. Cardionatrina I (peptidul identificat și caracterizat de A. de Bold și colab. în 1981) este principala formă circulantă a FNA. Celelalte peptide sînt rezultatul artefactelor (hidrolizei) apărute în timpul procedurilor de izolare și purificare. Activitatea vasodilatatoare a diferitelor peptide atriale este, în ordine descrescătoare, următoarea: (1—28) = FNA (2—28) FNA = (3—28) FNA > (4—28) FNA = (4—27) FNA > (5—28) FNA = (5—27) FNA > > > (5—25) FNA. (Numerele dintre paranteze reprezintă numerele de ordine ale aminoacizilor din extremele fiecărui polipeptid, conform numerotării aminoacizilor din schemă, celelalte denumiri fiind eliminate și fiind menționată pentru toate peptidele prescurtarea de FNA—cf. T. Maack și colab., 1986.)

Electronomicroscopic, matricea citoplasmatică a fibrelor Purkinje are densitate scăzută. Miofilamentele sînt aranjate în miofibrilele dispuse separat, fiind puține la număr și localizate la periferia celulei, cu orientare în general paralelă cu axul lung al celulei. Mitocondriile sînt numeroase și orientate la întîmplare. Reticulul sarcoplasmic este slab dezvoltat. Matricea citoplasmatică conține o mare cantitate de granule de glicogen.

Ceea ce caracterizează morfologia și ultrastructura celulelor Purkinje, ca de altfel a tuturor celulelor ce constituie sistemul excitoconductor, este absența tubilor T, sarcolemali (fig. 8.78).

Joncțiunile dintre fibrele Purkinje sînt de tip desmozomal și *gap*, tipuri care de altfel se întîlnesc între celulele sistemului excitoconductor unde lipsesc discurile intercalare.

Electrofiziologic, s-a constatat că la nivelul celulelor P, curentul de intrare a Ca^{2+} prin canalele pentru Ca^{2+} este singurul răspunzător de întregul potențial de acțiune al acestora. Celulele P fie nu au canale pentru Na^{+}, fie acestea sînt prezente dar nefuncționale. Astfel Ca^{2+} este singurul ion responsabil de activitatea normală de *pace-maker* din nodul SA și AV, explicînd susceptibilitatea lor la efectele drogurilor care blochează canalele pentru Ca^{2+}.

Scanned with OKEN Scanner

Celulele Purkinje conțin atît canale pentru Na^{2+} cît și pentru Ca^{2+} (la fel ca și miocardocitele lucrătoare), dar fiind lipsite de sistem T, se explică astfel conducerea rapidă a undei de depolarizare de către acestea.

Catecolaminele, ca modulatoare ale cronotropismului, și-ar exercita acțiunea numai asupra nodului sinoatrial, singurul loc unde sînt prezenți receptori beta-2.

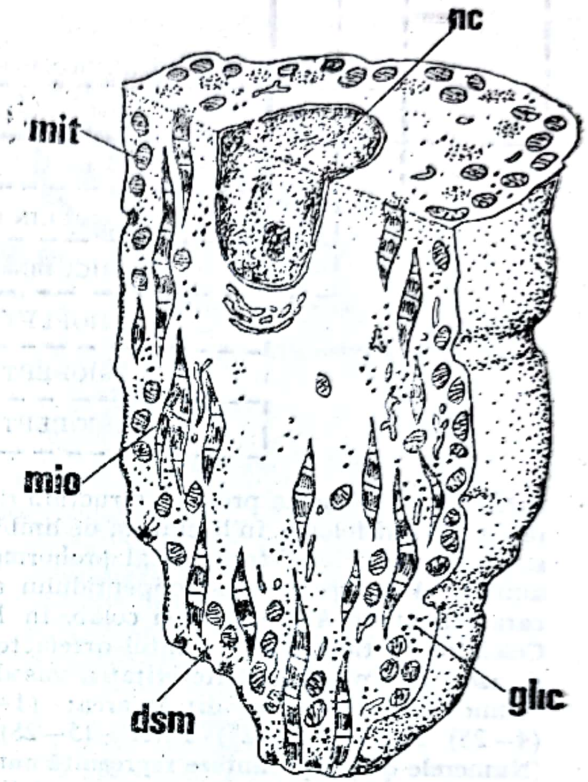


Fig. 8.78. — Structura celulei Purkinje (schemă): *mit* — mitocondrie; *nc* — nucleu; *mio* — miofibrile; *glic* — glicogen; *dsm* — desmozom.

8.3.3.1. Organizarea histologică a sistemului excitoconductor cardiac

Sistemul excitoconductor, conform conceptului clasic, este compus din: nodul sinoatrial (SA), nodul atrioventricular (AV), fasciculul His cu ramurile sale, precum și arborizația sa terminală, rețeaua subendocardică Purkinje (fig. 8.79 A și B).

Planul organizării formațiunilor care constituie sistemul excitoconductor constă, pentru nodul SA și AV, din dispunerea sub formă de grămezi, localizate central în nod, a celulelor P, printre acestea și la periferia nodului aflîndu-se celulele T (fig. 8.80).

Celulele Purkinje formează corpul principal al fasciculului His, precum și ramurile sale, ca de altfel și ramificațiile terminale subendocardice. Fasciculul His are o structură asemănătoare unui cablu, celulele Purkinje care-l compun avînd diametrul lung orientat paralel cu axul său longitudinal.

Sistemul excitoconductor are la periferia sa o lamă fină de țesut conjunctiv.

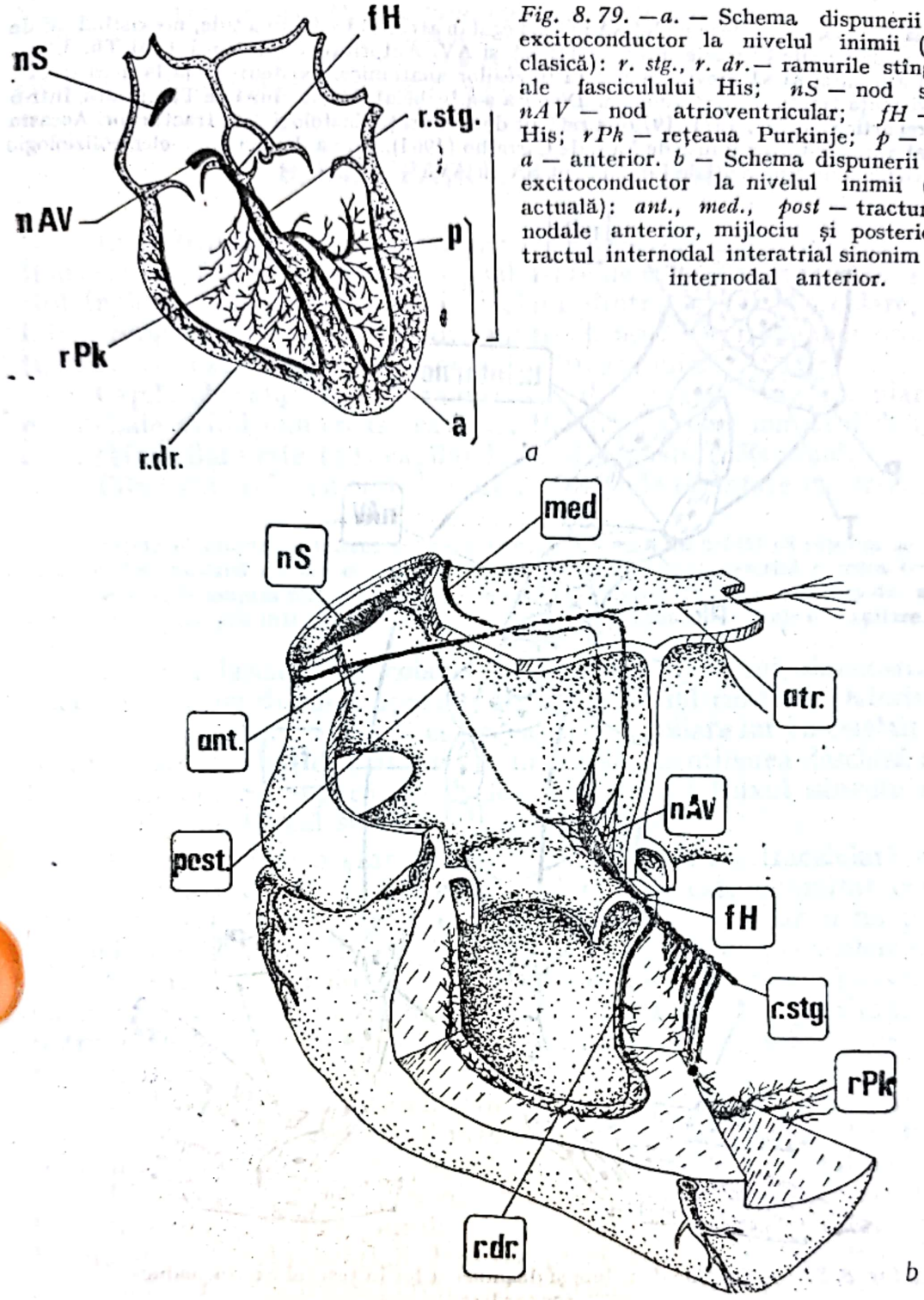


Fig. 8. 79. —a. — Schema dispunerii țesutului excitoconductor la nivelul inimii (concepția clasică): *r. stg., r. dr.*— ramurile stîng și drept ale fasciculului His; *nS* — nod sinoatrial; *nAV* — nod atrioventricular; *fH* — fascicul His; *rPk* — rețeaua Purkinje; *p* — posterior; *a* — anterior. *b* — Schema dispunerii țesutului excitoconductor la nivelul inimii (concepția actuală): *ant., med., post* — tracturile internodale anterior, mijlociu și posterior; *atr.* — tractul internodal interatrial sinonim cu tractul internodal anterior.

*Tracturile internodale**

Controversa asupra existenței și funcționării tracturilor internodale a început după ce Th. Lewis (1914, 1915) a emis părerea, acceptată pînă nu de mult ca un adevăr de necontestat,

* Deosebit de tracturile internodale, au mai fost descrise fascicule musculare accesorii care, în mod anormal, leagă musculatura atrială de cea ventriculară (fasciculul Kent, fasciculul atriohisian James, fasciculul atrionodal Meheim). Musculatura atrială, în mod normal, este complet separată de cea ventriculară. Prezența acestor fascicule explică apariția tahiaritmiilor în sindroamele de preexcitație.

Scanned with OKEN Scanner

că excitația se răspîndește de la nodul SA în mod egal în atrii, în toate direcțiile, neexistînd căi de conducere preferențiale (speciale) între nodul SA și AV. Autoritatea științifică a lui Th. Lewis a făcut ca afirmația sa să prevaleze asupra dovezilor anatomice, existente deja la acea dată*, privind existența tracturilor internodale. Disputa s-a încheiat recent, după ce Th. James, într-o suită de trei articole (1963, 1971, 1979), a refăcut demonstrația histologică a tracturilor. Aceasta s-a alăturat argumentărilor aduse de Paes de Carralho (1961), care a demonstrat electrofiziologic existența conducerii preferențiale între nodul SA și AV.

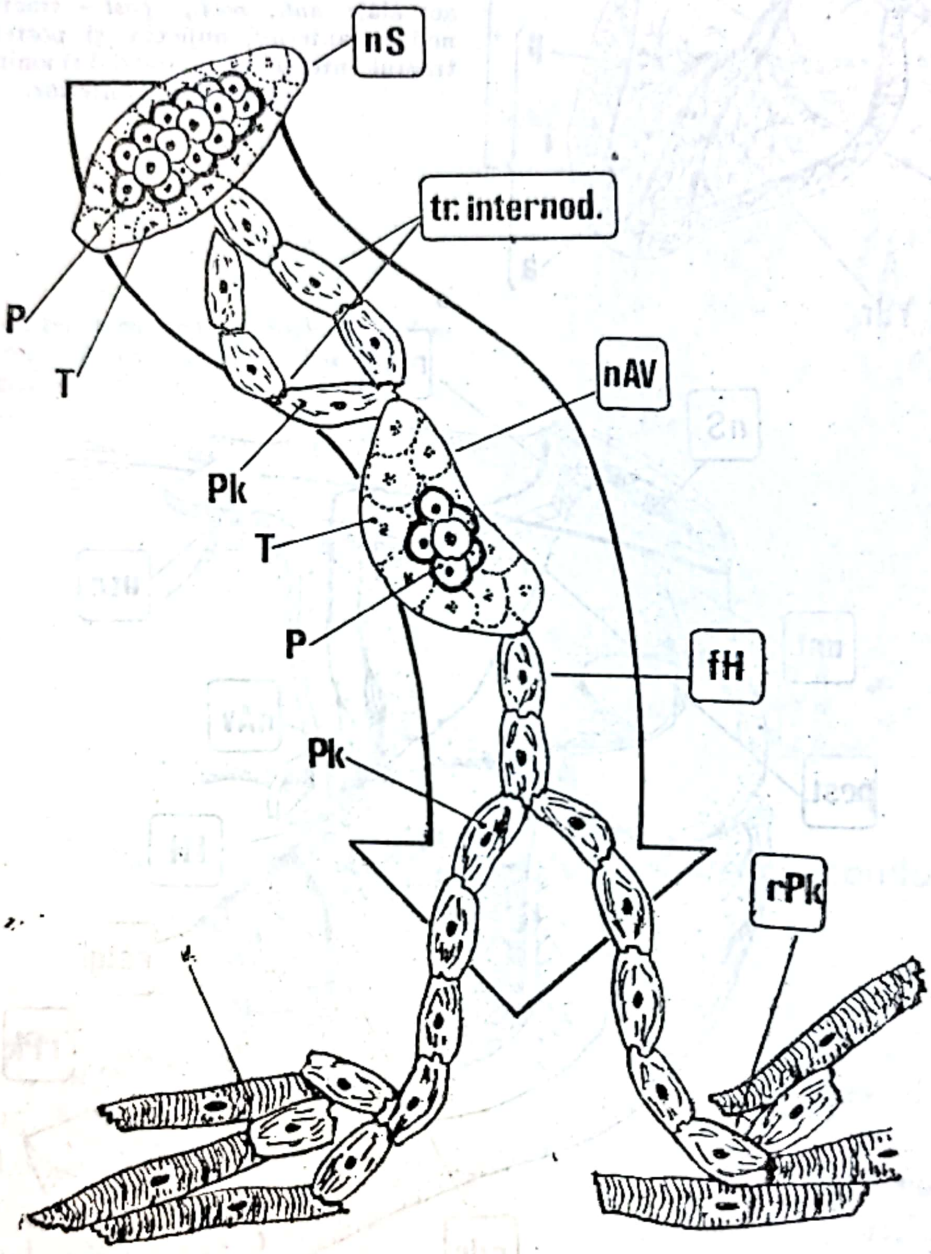


Fig. 8. 80. — Tipurile de celule și dispunerea lor în țesutul excitoconductor cardiac:
P — celule P; *T* — celule T; *Pk* — celule Purkinje; *ns* — nodul sinusal; *nAV* — nod atrioventricular; *tr. internod.* — tracturi internodale; *fH* — fasciculul His; *rPk* — rețeaua Purkinje; *L* — miocardocite lucrătoare ventriculare.

* Wenkebach (1907) descrie tractul internodal mijlociu, Thorel (1910), pe cel inferior și Bachman (1916) pe cel anterior (bandeleta miocardică interatrială anterioară).

Tracturile internodale (James, 1979; Liebman, 1985) sînt formate din celule cu aspectul celulelor Purkinje. Actualmente, validate morfologic și funcțional, tracturile internodale sînt incluse, cu funcția de conducere normală a impulsului de la nodul SA la nodul AV, în sistemul excitoconductor normal al inimii (fig. 8.79 B).

8.3.4. SPAȚIUL EXTRACELULAR *

Interstițiul mușchiului cardiac conține vase sanguine, celule ale țesutului conjunctiv, fibroblaști în special, fibre de colagen, nervi. Aceste elemente sînt înglobate în matricea extracelulară dintre fibrele musculare, compusă într-o proporție considerabilă din proteoglicani. Electronomicroscopic aspectul matricei extracèlulare este omogen, fin granular.

Capilarele sanguine sînt numeroase, de tip continuu (muscular), celulele endoteliale avînd numeroase caveole. Raportul dintre numărul de fibre musculare și capilare este 1 : 1, capilarele fiind în medie 3 500/mm^2.

Fibrele de colagen sînt dispuse în fascicule orientate în direcții diferite.

Studii efectuate cu microscopul electronic cu baleiaj au arătat că rețeaua de fascicule de colagen din miocard nu are o dispunere întîmplătoare. A fost descrisă o rețea complicată de fascicule, care înconjură miocardocitele și le izolează în grupuri, în fiecare grup de miocardocite fasciculele de colagen interconectînd celulele între ele sau miocardocitele de capilare.

Funcția fasciculelor colagenice este de a preveni alunecarea fibrelor miocardice, asigurîndu-se apoziția strînsă în ciclul cardiac. Datorită fasciculelor de colagen care se inseră cu un capăt pe capilare iar cu celălalt pe suprafața miocardocitelor, este asigurată, în sistolă, menținerea deschisă a lumenului capilarelor. Se explică astfel de ce în sistolă fluxul sanguin reprezintă totuși 25% din fluxul sanguin coronarian total.

Nu există nici o graniță clară între matricea extracelulară și învelișul tip membrană bazală al miocardocitelor, care este delimitat convențional (fiind aproximat la 50 nm) de faptul că fibrele de colagen nu pătrund în spațiul pericelular decît pînă la distanța de 50 nm de plasmalemă.

În învelișul tip membrană bazală al miocardocitelor lucrătoare pot fi observate miofibrile, cu diametrul de 7—10 nm, care reprezintă, prin întrepătrunderea cu fibrele de colagen, încă un mijloc de solidarizare între ele a fibrelor musculare.

Sînt de asemenea prezente în spațiul extracelular și rare fibre elastice.

Fibroblaștii reprezintă, dintre celulele țesutului conjunctiv, tipul celular cel mai frecvent întîlnit în spațiul extracelular din miocardul lucrător.

Fibrele nervoase sînt nemielinizate, de tip autonom, prezente în cantitate mare în special în regiunile nodurilor SA, AV și în peretele atriului drept. Există și receptori senzoriali, baroreceptori, celule nervoase de tip ganglionar și cromafin, răspîndite în peretele miocardic, mai ales subepicardic.

Terminațiile nervoase au acumulări de vezicule clare sau vezicule cu conținut electronodens, fiind deci de tip colinergic și adrenergic.

Terminații nervoase de tip adrenergic și colinergic se găsesc mai ales la nivelul nodului sinusal, cele de tip colinergic predominînd în porțiunea posterioară a nodului atrioventricular.

* Spațiul extracelular în miocard include și spațiul cuprins în sistemul tubular transvers (sistemul T sarcolemal).

Scanned with OKEN Scanner

La om, au fost descrise terminații nervoase adrenergice mult mai frecvent în ventriculi decît în atrii.

Interrelațiile neuromusculare în miocard nu îmbracă niciodată aspectul de placă motorie întîlnit în musculatura scheletică. În miocard, terminațiile nervoase se găsesc la distanță de fibrele musculare lucrătoare, aceasta fiind de 20—50 nm. Uneori, plasmalema celulei musculare are în dreptul terminației nervoase o depresiune. În cazul în care distanța între terminația nervoasă și fibra musculară este în jur de 20 nm, învelișul tip membrană bazală care acoperă terminația nervoasă se continuă cu cel al fibrei musculare, spațiul dintre ele rămînînd aparent gol.

8.3.5. ADAPTAREA ȘI REGENERAREA MIOCARDULUI

Miocardul (fibrele musculare cardiace lucrătoare) se adaptează la impunerea unui efort crescut (creșterea presarcinii sau/și postsarcinii) prin creșterea volumului lor (a grosimii și lungimii fibrelor) și, respectiv, a suprafeței sarcolemale concomitent cu cea a masei proteinelor contractile și a numărului mitocondriilor. Acestea sînt, în mare, modificările morfologice care caracterizează fibra musculară cardiacă hipertrofiată.

Este un fapt unanim acceptat că miocardul adult își mărește masa (hipertrofie) și nu numărul fibrelor sale (hiperplazie), miocardocitele adulte pierzîndu-și capacitatea de diviziune.

Studii efectuate pe animale de laborator par a arăta că miocardocitele atriale lucrătoare ale acestora ar fi capabile totuși de diviziune, în anumite condiții, celor ventriculare lipsindu-le însă această proprietate (P. P. Rumiantev, 1982).

Creșterea masei cordului se datorează nu numai hipertrofiei miocardocitelor, ci și unei importante hiperplazii a celulelor conjunctive. Ca urmare, crește și cantitatea de colagen interstițial miocardic.

Creșterea cantității de colagen miocardic ar fi răspunzătoare de modificarea complianței miocardului ventricular, a proprietăților sale vîsco-elastice și, ca atare, a performanțelor cordului ca pompă.

Carcateristicile morfologice ale procesului adaptativ miocardic se mențin și atunci cînd o parte din fibrele miocardice mor (se necrozează). Cea mai frecventă situație de acest fel apare în urma unei tromboze coronariene (infarct). Și în aceste condiții nu are loc nici o regenerare a miocardocitelor, înlocuirea țesutului pierdut făcîndu-se prin proliferarea celulelor conjunctive cu producerea de țesut conjunctiv cicatriceal.

8.3.6. HISTOGENEZA ȚESUTULUI MUSCULAR CARDIAC

Mușchiul cardiac se formează la embrion din splanhnopleură care se învecinează cu endoteliul primordiumului cardiac. Această porțiune a splanhnopleurei are aspect de epiteliu și este denumită miocard embrionar. În miocardul embrionar celulele se divid activ prin mitoză. Se observă concomitent dezvoltarea de dispozitive joncționale intercelulare atît de tip *gap* cît și desmozomale, în timp ce citoplasmele încep să conțină mănunchiuri de miofilamente.

Ulterior, zona miocardului embrionar este invadată de vase sanguine și mezenchim care dezorganizează epiteliul, dîndu-i aspectul de cordoane celulare dispuse în rețea. Celulele miocardice primitive continuă să se dividă edificînd miocardul. Se apreciază că activitatea de diviziune a celulelor miocardice continuă încă o perioadă după naștere.

Scanned with OKEN Scanner

8.4. ȚESUTUL MUSCULAR NETED

8.4.1. GENERALITĂȚI

8.4.1.1. Răspîndire

Spre deosebire de mușchii striați, mușchii netezi nu formează organe anatomic individualizate, țesutul muscular neted reprezentînd doar o parte integrantă, alături de alte țesuturi, în alcătuirea diverselor organe. Fibrele musculare netede formează tunicile contractile ale organelor cavitare (cu excepția cordului). Astfel, fibrele musculare netede sînt prezente: *a*) în tubul digestiv de la treimea mijlocie a esofagului pînă la sfincterul anal intern, precum și în pereții canalelor excretoare ale glandelor anexe; *b*) în arborele respirator de la trahee și pînă în proximitatea alveolelor; *c*) în conductele aparatului uro-genital și *d*) în tunica medie a arterelor și venelor, dar și a limfaticelor mari. Tot fibre musculare netede sînt și acelea care formează mușchii erectori ai firelor de păr și mușchii intrinseci ai globilor oculari (mușchii irisului și ai corpului ciliar). În plus, fibre musculare netede, mai mult sau mai puțin izolate, se mai găsesc în: capsula și trabeculele splenice, capsula ganglionilor limfatici, țesutul subcutanat al scrotului, penisului, perineului, mamelonului sau în țesutul conjunctiv al orbitei și al ligamentelor largi și în pleura viscerală.

8.4.1.2. Dispoziția fibrelor musculare netede

Elementul specific în arhitectura țesutului muscular neted (fig.8.81) este *fasciculul* format dintr-un grup de 20—100 de fibre musculare cu orientare similară.

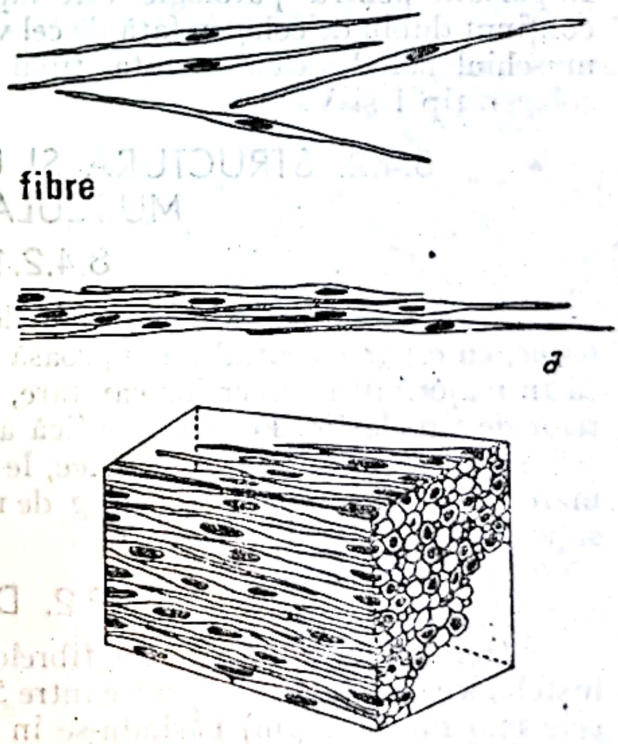


Fig. 8. 81. — Forma fibrelor musculare netede și dispoziția lor caracteristică în fascicule: *a* — secțiune longitudinală; *b* — reprezentare spațială.

La rîndul lor, fasciculele formează în pereții viscerelor cavitare, prin apoziție, fie *straturi* longitudinale, circulare sau oblice, fie *mase* musculare în genul detrusorului vezical sau miometrului.

În cadrul aceluiași fascicul fibrele musculare netede sînt astfel dispuse încît corpul unei fibre (porțiunea centrală mai dilatată) se găsește în raport cu extremitățile efilate ale fibrelor musculare învecinate, dînd aspecte microscopice caracteristice în secțiune transversală și longitudinală. Solidarizarea fibrelor musculare netede într-un fascicul este realizată prin elemente conjunctive.

8.4.1.3. Spațiul extracelular (matricea extracelulară)

În contrast cu mușchiul scheletic, în care spațiul extracelular este cuprins între 7 și 10% din volumul său, nu există mușchi netezi în care spațiul extracelular să fie mai mic de 15%. De cele mai multe ori, spațiul extracelular reprezintă 1/4—1/2 din volumul mușchiului neted (exemplu 25—30% în mușchiul neted intestinal sau 50—60% în media aortei).

Colagenul este componenta majoră a matricei extracelulare din mușchii netezi. Fibrilele de colagen au o grosime de 30—35 nm, fiind ceva mai subțiri decît fibrilele de colagen din alte țesuturi și, conform nomenclaturii mai vechi, ar aparține categoriei de „fibrile de reticulină", vizibile la microscop după impregnarea lor argentică. Fibrilele de colagen se asamblează în grupuri în septurile conjunctive dintre fasciculele musculare și devin astfel vizibile ca fibre de colagen la microscopul optic. Determinările cantitative ale concentrației de colagen (mg colagen/g țesut greutate umedă) redate în continuare (după Gabella, 1979), arată că mușchii netezi viscerali conțin de cca 3 ori mai mult colagen decît miocardul, dar mult mai puțin decît tendonul.

— tendon	197	— mușchi neted intestinal	32
— mușchi scheletic	9	— miometru	36
— miocard	6	— mușchi neted vascular	78

Important pentru patologie este faptul că mușchiul neted vascular are un conținut dublu de colagen față de cel visceral. Tipul predominant de colagen în mușchiul neted vascular este tipul III, dar se găsesc și mici cantități de colagen tip I și V.

8.4.2. STRUCTURA ȘI ULTRASTRUCTURA FIBREI MUSCULARE NETEDE

8.4.2.1. Forma

Forma fibrelor musculare netede poate îmbrăca două aspecte: fie *fuziforme*, cu o parte centrală mai groasă și extremitățile alungite (vezi fig. 8.81), ca în majoritatea viscerelor cavitare, fie *neregulat-ramificate*, în media arterelor de tip elastic. Forma specifică a fibrelor musculare netede, în raport cu cele striate scheletice sau cardiace, le conferă un raport suprafață/volum mai mare. De aceea, spre exemplu, 1 g de mușchi neted intestinal cuprinde 1 m² de suprafață (membrană) celulară.

8.4.2.2. Dimensiunile

Dimensiunile medii ale fibrelor musculare netede, conform datelor histologice clasice, sînt cuprinse între 50—100 μm lungime și 4—6 μm grosime, cele mai mici (20 μm) găsindu-se în pereții vaselor mici, iar cele mai mari

Scanned with OKEN Scanner

(pînă la 500 μm) în uterul gravid. Trebuie precizat că date recente arată că lungimea fibrelor musculare netede viscerale a fost în general subestimată (o cauză posibilă fiind ieșirea din planul secțiunii, în cazul lungimilor de mai multe sute de μm). Măsurători efectuate pe fibre musculare netede izolate arată că lungimea lor (în cazul celor din stomac, intestin sau uter) depășește 500 μm, putînd ajunge pînă la 1 mm. În medie, 1 mm^3 de mușchi neted visceral conține cam 200 000 de celule musculare.

8.4.2.3. Organizarea generală

Fibra musculară netedă este o celulă tipică, uninucleată, cu nucleul situat central (în porțiunea mijlocie) și cu citoplasma (sarcoplasma) în care se pot descrie două zone: o porțiune centrală, cuprinzînd organitele comune, și o porțiune periferică în care se găsește aparatul contractil (miofilamente și corpi denși) (fig. 8.82). Învelișul fibrei musculare netede (sarcolema) are unele caracteristici (un număr foarte mare de caveole, prezența de arii dense, joncțiuni intercelulare) care-l deosebesc de sarcolema fibrei striate (fig. 8.83). Tabelul 8. XVII arată volumul ocupat de principalele componente celulare (compară cu tabelul 8. XIII).

8.4.2.4. Nucleul

Nucleul, totdeauna unic și situat central (vezi fig. 8.83), are formă de elipsoid alungit cu dimensiunile de cca 10/2 μm. Axul lung al nucleului este paralel cu axul lung al celulei. În fibra contractată, nucleul se scurtează și devine spiralizat (în tirbușon).

Structural, nucleul fibrei musculare netede apare alcătuit din aceleași componente ca oricare nucleu. De regulă, nucleul fibrelor musculare netede este *eucromatic* (morfometric eucromatina ocupă cca 2/3 din conținutul nuclear), cu blocuri de heterocromatină atașate pe versantul intern al înveli-

Fig. 8.82. — Imagine electronomicroscopică a unui grup de fibre musculare netede: *N* — nucleu; *m* — mitocondrii; *mf* — miofilamente.

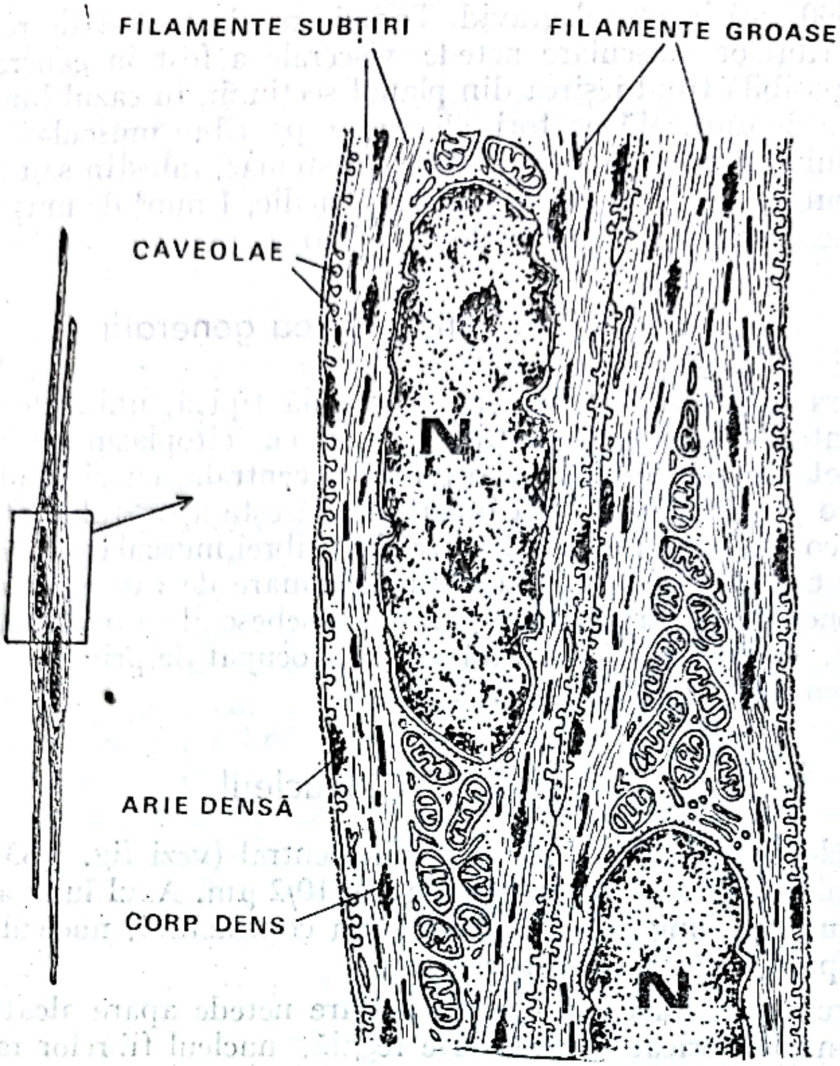


Fig. 8. 83. — Organizarea generală ultrastructurală a fibrelor muscu lare netede.

TABELUL 8.XII

Volumul unor componente celulare exprimat procentual față de volumul total al fibrei musculare netede*

Componenta celulară	Volumul ocupat (procente din volumul total al fibrei)
Nucleul	10—12
Miofilamentele (inclusiv corpii denși)	75—80
Mitocondriile	4—6
Reticulul sarcoplasmic	2—5
Microveziculele de suprafață**	3

* Datele reprezintă medii ale rezultatelor morfometrice publicate de L. M. Popescu și colab., 1974; Gabella, 1976; A. P. Somlyo și colab., 1977.

** Sinonim: *caveolae.*

Scanned with OKEN Scanner

șului nuclear (vezi fig. 8.84) și cu unul sau doi nucleoli ușor vizibili. Aspectul eucromatic este în directă legătură cu activitatea biosintetică puternică a fibrelor netede.

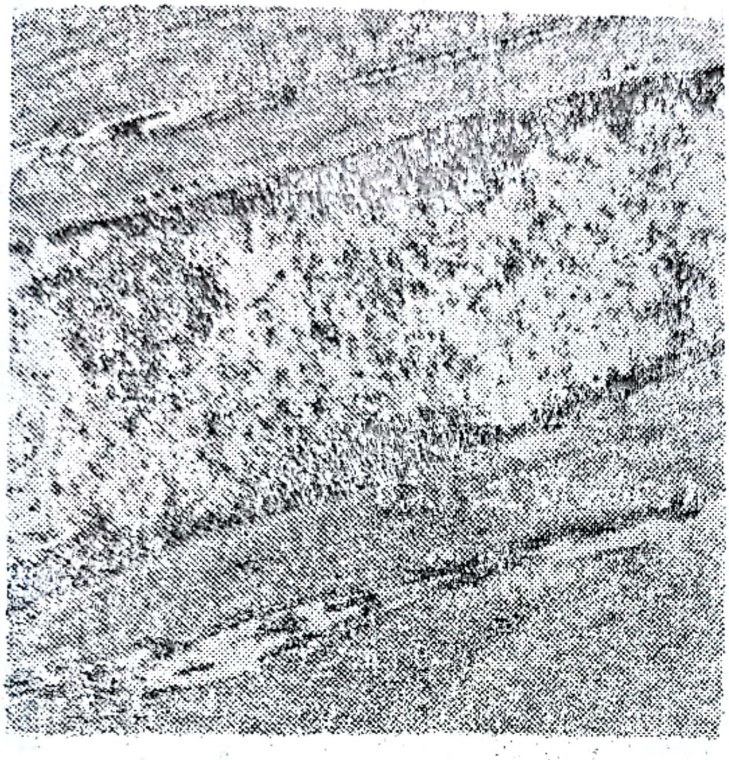


Fig. 8.84. — Ultrastructura nucleului din fibra musculară netedă. Se remarcă aspectul predominant eucromatic cu blocuri de heterocromatină atașate de învelișul nuclear; nucleolul este evident.

8.4.2.5. Învelișul celular (sarcolema)

Învelișul celular al fibrelor musculare netede este similar celorlalte tipuri de mușchi, fiind format din sarcolema propriu-zisă și membrana bazală (vezi: sarcolema fibrei striate și fig. 8.7), cu deosebirea că așa-zisa lamă bazală este de două ori mai subțire decît la fibra striată. Sarcolema fibrelor netede, spre deosebire de cea a fibrelor striate, *nu* prezintă tubi T, dar la nivelul ei se pot deosebi trei zone de specializare morfofuncțională, care nu sînt prezente la fibrele musculare scheletice: caveolele, ariile dense și joncțiunile intercelulare.

8.4.2.5.1. Caveolele*

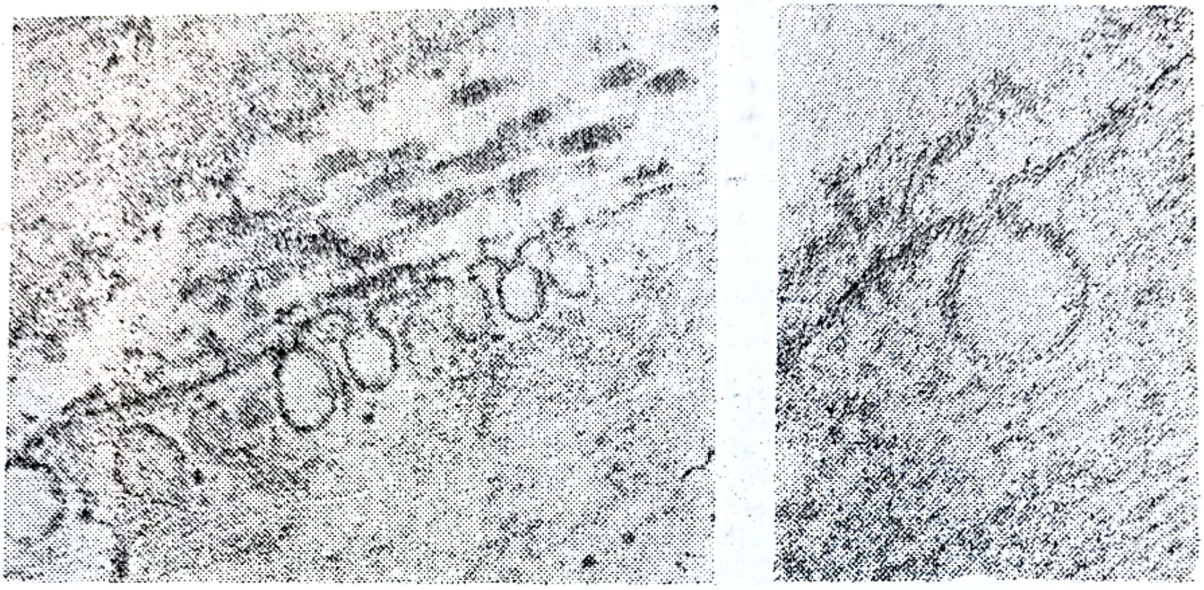
Caveolele sînt microinvaginații ale plasmei fibrei musculare netede (vezi fig. 8.85 a și b), cu formă veziculară sau turtită, care comunică, probabil liber, cu spațiul extracelular. Lamina bazală nu pătrunde în interiorul lor. În medie au dimensiuni de: 70 nm grosime și 120 nm lungime. Orificiile lor de comunicare cu spațiul extracelular au dimensiuni în jur de 35 nm.

Număr și așezare. Fiecare celulă musculară netedă de dimensiuni medii are circa 150 000 de caveole, ceea ce sugerează că ele trebuie să aibă un rol

* *Sinonime:* microvezicule de suprafață, vezicule de suprafață, vezicule plasmalemale. Termenul folosit în urmă cu 20—30 de ani, de vezicule micropinocitotice, nu corespunde deloc realității, deoarece aceste vezicule nu sînt (micro)pinocitotice, adică nu se desprind de plasmalemă spre interiorul celulei musculare netede. Ele se deosebesc de veziculele (pinocitotice) din celulele endoteliale ale capilarelor și nu au funcție de endocitoză sau transcitoză.

Scanned with OKEN Scanner

important în funcţia muşchiului neted. Prin prezenţa caveolelor suprafaţa fibrei musculare netede este crescută cu cca 70% faţă de situaţia simplă geometrică de dublu con efilat. Reconstrucţiile tridimensionale au demonstrat faptul că aceste caveole nu sînt dispuse la întîmplare, ci apar distribuite în şiruri (benzi) paralele cu axul longitudinal al fibrei, benzile de caveole fiind despărţite prin ariile dense (vezi fig. 8.83).



a b

Fig. 8.85. — Microveziculele de suprafaţă, caracteristice fibrelor musculare netede: *a* — un şir de microvezicule de suprafaţă la mărire mijlocie; *b* — detaliu, mărire mare (peste 100 000) arătînd continuitatea clară a sarcolemei cu membrana microveziculei şi aspectul trilaminat în ambele cazuri.

Rol(uri). Aparent, caveolele sînt echivalenţi ai tubilor T din fibra musculară striată scheletică sau cardiacă. Dar nu sînt tubi (!), sînt mai largi decît tubii T şi pătrund foarte puţin în adîncimea fibrei. De altfel, prin însăşi grosimea lor foarte mică, fibrele musculare netede nici nu au nevoie de astfel de dispozitive. Deşi este clar că aceste caveole sînt „prelungiri" ale spaţiului extracelular în interiorul fibrei musculare netede, aşa cum s-a arătat cu *marker*-ii electronoopaci, funcţia lor nu este încă stabilită. Există două ipoteze: *a*) ar fi senzori de întindere (Prescott, 1976), dar numărul lor este prea mare pentru un asemenea rol, şi *b*) ar fi implicate în homeostazia intracelulară a Ca^{2+} (L.M.Popescu, 1974, 1977).

8.4.2.5.2. Ariile dense*

Aspect şi dimensiuni. Ariile dense sînt zone de material electronoopac ataşate pe versantul intern al plasmalemei (vezi fig. 8.83). Membrana celulară

* *Sinonime:* benzi dense, pete dense, corpi denşi ataşaţi membranei. Pînă în urmă cu cîţiva ani se considera că în fibra musculară netedă ar exista două feluri de corpi denşi: cei propriu-zişi, citoplasmici, şi cei asociaţi membranei celulare (ariile dense), deoarece s-a crezut că în ambele structuri este prezentă alfa-actinină. Actualmente este clar că alfa-actinina se găseşte numai în corpii denşi citoplasmici (Small, 1985) şi de aceea corpii denşi citoplasmici (leiozomi — *vide infra*) şi ariile dense trebuie considerate ca ultrastructuri diferite.

Scanned with OKEN Scanner

își menține structura tipică trilaminată; de aceea, *stricto sensu*, ariile dense nu sînt îngroșări ale membranei. Ariile dense pot fi mai ușor observate în secțiuni transversale, unde apar interpuse între grupurile de caveole, avînd dimensiuni de 0,1—0,4 micrometri. Ariile dense ocupă 30—50% din circumferința celulei în porțiunea mijlocie, corespunzătoare așezării nucleului, dar sînt mult mai numeroase spre extremitățile efilate ale celulei, unde pot ocupa pînă la 100% din profilul ei pe secțiune transversală.

Electronomicroscopic se observă clar pătrunderea filamentelor subțiri de actină, sub un unghi foarte ascuțit, în ariile dense.

Compoziție chimică. Deși în anii '70 s-a crezut că în ariile dense sînt prezente alfa-actinina și filamina, după 1980 s-a dovedit că aceasta nu corespunde relalității. Componentul chimic principal este proteina *vinculină* (lat. *vinculum* = legătură), cu greutate moleculară 135 000 (Geiger și colab., 1981; Small, 1985). Alături de vinculină mai sînt prezente în ariile dense cel puțin alte două proteine: *metavinculina* (G.M. 150 000), înrudită imunologic cu vinculina, și *talina* (G. M. 215 000), care are capacitatea de a se lega de vinculină.

Rolul ariilor dense pare să fie cel de *locuri de atașare pentru filamentele subțiri de actină*, ancorîndu-le de membrana plasmatică.

8.4.2.5.3. Joncțiunile intercelulare

Între fibrele musculare netede există cel puțin trei feluri de joncțiuni intercelulare: *a*) joncțiuni comunicante, *b*) joncțiuni intermediare și *c*) apoziții prin proiecții digitiforme (fig. 8.86). Între fibrele musculare netede nu există joncțiuni strînse *(maculae occludentes)* sau septate (desmozomi), ca între celulele epiteliale. Așa-zisele joncțiuni strînse, descrise în urmă cu cca 10—20 de ani între fibrele netede, s-au dovedit a fi în realitate joncțiuni comunicante.

a) *Joncțiunile comunicante* (nexus, joncțiune, *gap*) (fig. 8.86 b) ocupă în medie pînă la 1% din suprafața fibrelor musculare netede. Din punct de vedere ultrastructural și al organizării moleculare nu diferă de joncțiunile

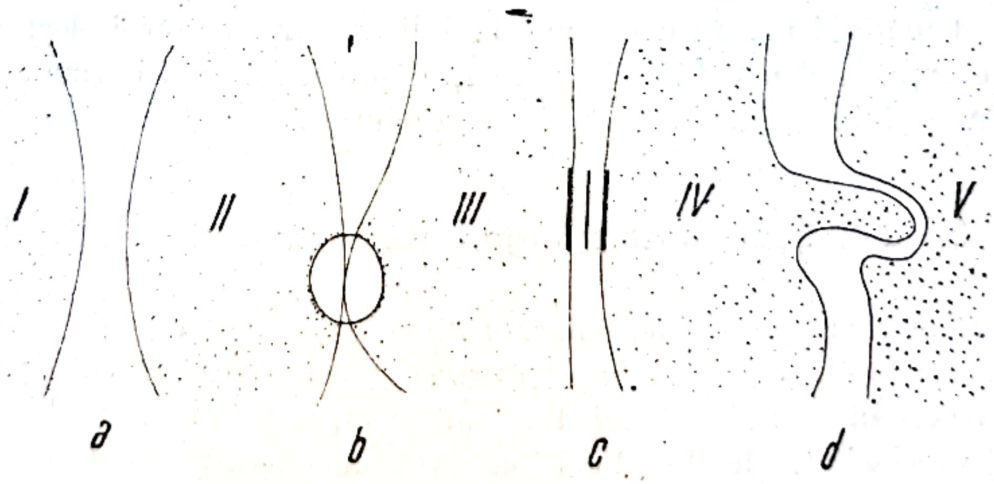


Fig. 8.86. — Tipurile de joncțiuni între fibrele musculare netede: *a* — spațiul intercelular; *b* — joncțiune comunicantă (nexus, *gap*); *c* — joncțiune intermediară (de tip desmozomal); *d* — proiecție digitiformă.

comunicante din alte țesuturi (vezi detalii la fibra musculară cardiacă lucrătoare, discurile intercalare). Din punct de vedere funcțional ele au două roluri importante: *cuplarea electrică și metabolică* dintre celulele musculare netede. Nexus-urile sînt căi intercelulare de rezistență electrică scăzută (de cca 100 de ori mai mică decît în restul sarcolemei), ceea ce asigură trecerea rapidă a semnalului electric de la o celulă la alta (cuplare electrotonică). Ele reprezintă substratul morfologic (ultrastructural) al proprietății de conductibilitate, prezentă la mușchii netezi ca și în mușchiul cardiac, dar absentă în țesutul muscular scheletic. De asemenea, joncțiunile comunicante permit trecerea de la o celulă la alta a unor ioni și molecule mici (exemplu: aminoacizi, monozaharide, nucleotizi etc.). Trebuie subliniat că joncțiunile comunicate sînt structuri dinamice, care se pot asambla și dezasambla în funcție de stimul și de starea funcțională.

b) Joncțiunile intermediare (plăci de atașare) (fig. 8.86 c) sînt varietăți de joncțiuni tip *adherens* (vezi *fascia adherens* la discurile intercalare), cu un spațiu intercelular de 40—60 nm și cu acumulări de material electronoopac pe frontul sarcoplasmic. Semnificația funcțională a joncțiunilor intermediare este *mecanică*, de solidarizare intercelulară. Ele reprezintă „puncte fixe" (false inserții), care, prin prezența lor, permit exteriorizarea contracțiilor fibrelor musculare netede individuale ca o contracție a mușchiului neted respectiv *in toto*.

Joncțiunile intermediare trebuie deosebite clar de desmozomi, în care spațiul intercelular este mai larg, septat și în care în membranele adiacente apar particule intramembranare caracteristice, reprezentînd probabil legături transmembranare. Mai mult, desmozomii sînt conectați cu filamente intermediare (exemplu tonofilamentele celulelor epiteliale), în timp ce joncțiunile intermediare sînt asociate cu filamente de actină (Gabella, 1984).

c) Apoziții prin proiecții digitiforme (protruzii și intruzii) (fig. 8.86 d) sînt prelungiri cu forme și dimensiuni diferite, pe care o celulă musculară netedă le trimite spre celulele învecinate, în așa fel încît o evaginare a unei celule pătrunde într-o invaginare a celulei adiacente, stabilind un angrenaj intercelular de tip roată dințată. Nu se cunoaște semnificația funcțională a acestui gen de contacte intercelulare. Trebuie însă precizat că existența lor a fost motivul pentru care, pînă la aplicarea microscopiei electronice, s-a crezut că mușchiul neted ar fi un sincițiu (proiecțiile digitiforme apăreau ca punți intercelulare, datorită puterii de rezoluție limitate).

8.4.2.6. Sacroplasma, organitele comune și incluziunile

Sarcoplasma fibrei musculare netede este compusă dintr-o matrice în care se găsesc: *organite celulare comune* (mitocondrii, reticul endoplasmic rugos, ribozomi, complex Golgi, lizozomi, centrozom, microtubuli etc.), care asigură procesele vitale ale celulei, *incluziuni* de glicogen și lipide, care reprezintă rezerve energetice, precum și un aparat contractil și un reticul sarcoplasmic, care pot fi considerate ca *organite specifice*, ele stînd la baza contracției și a reglării ei (fig. 8.87—8.89).

Scanned with OKEN Scanner

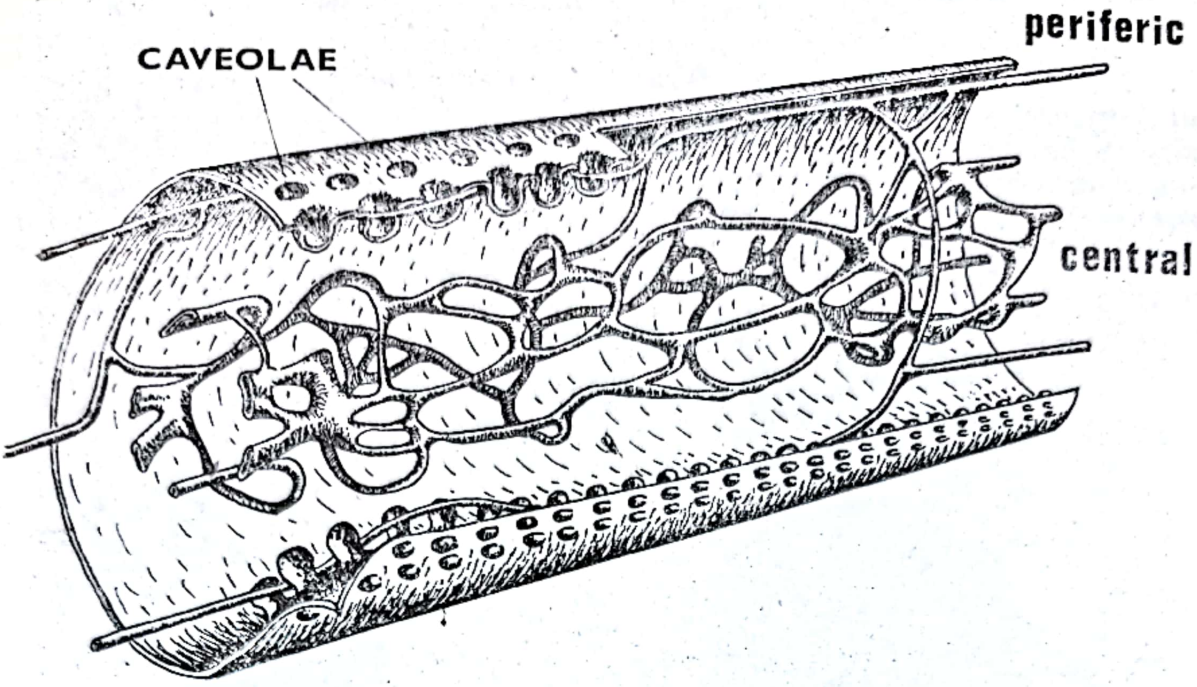


Fig. 8.87. — Reprezentare tridimensională a organizării reticulului sarcoplasmic într-o fibră musculară netedă (după L.M. Popescu și W.C. de Bruijn, 1982).

Fig. 8.88. — Reticulul sarcoplasmic periferic printre microveziculele de suprafață (secțiune tangențială).

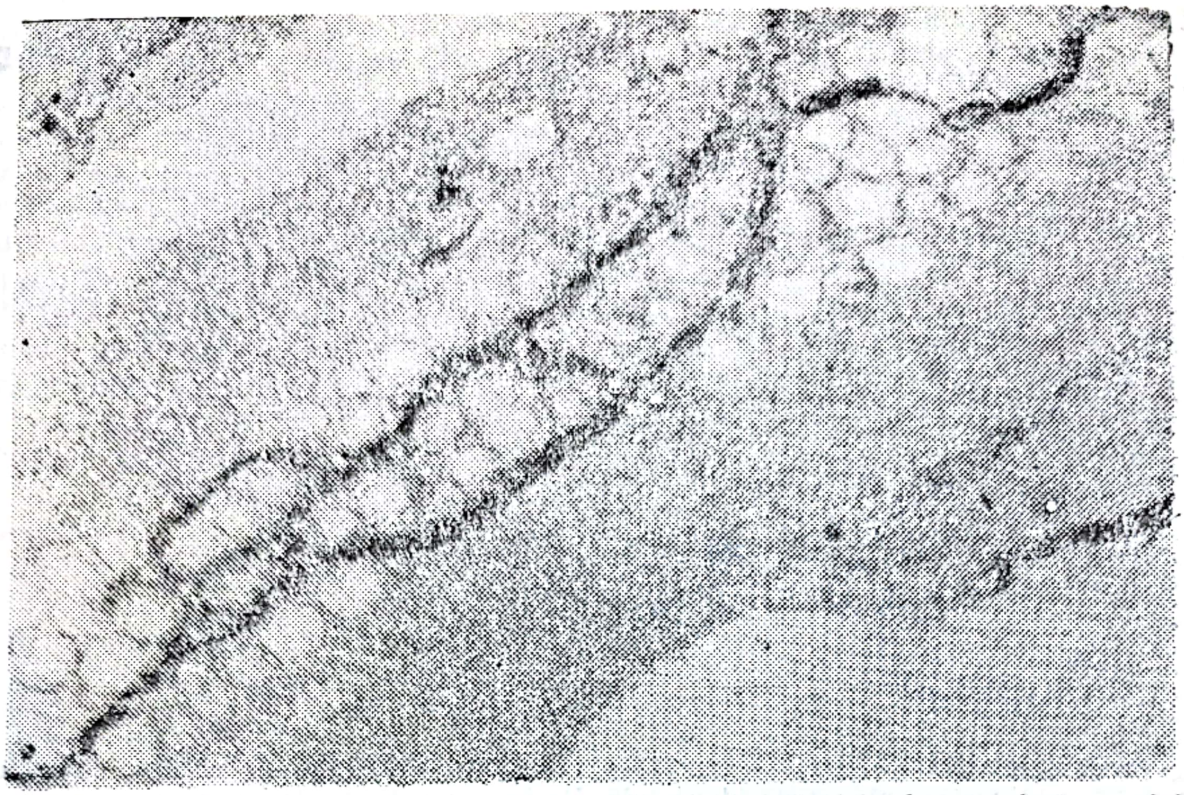


Fig. 8.89. — Reticulul sarcoplasmic periferic printre microveziculele de suprafață, conținînd depozite de Ca^{2+} evidențiate ultracitochimic cu oxalat ca *marker*.

8.4.2.6.1. Mitocondriile

Volumul ocupat de mitocondrii în fibra musculară netedă este de aproximativ 5% (tabelul 8.XVIII), similar celui ocupat de mitocondrii în fibra musculară striată scheletică (tabelul 8.XIII), ceea ce infirmă prejudecata tradițională conform căreia mitocondriile ar fi mai puține în fibrele netede decît în cele striate. Ultrastructura mitocondriilor din fibrele musculare netede este tipică mitocondriilor în general (vezi fig. 8.82, 8.83 și 8.90). Cele mai multe mitocondrii sînt de formă alungită, dar cele situate în vecinătatea polilor nucleului pot avea o formă rotund-ovalară sau neregulată. De regulă, orientarea mitocondriilor este paralelă cu axul longitudinal al celulei.

TABELUL 8.XVIII

Topografia intracelulară a mitocondriilor în fibra musculară netedă viscerală (L. M. Popescu, 1976)

Localizarea mitocondriilor	Procente din populația mitocondrială *
Sub membrana celulară	38,09
Printre miofilamente	27,28
În axul sarcoplasmic	26,95
La polii nucleului	7,68

* Datele au fost obținute pe o populație de 651 de mitocondrii din 100 de celule musculare netede intestinale de cobai.

Scanned with OKEN Scanner

Repartiția intracelulară a mitocondriilor (tabelul 8. XVIII) nu este întîmplătoare, ci apare dictată de necesitățile energetice locale intracelulare. Există trei regiuni intracelulare de concentrare a mitocondriilor: printre miofilamente, furnizînd energia, sub formă de ATP, necesară contracției, în axul sarcoplasmic al celulei, în vecinătatea altor organite, furnizînd energia necesară diferitelor procese de sinteză, și în imediata vecinătate a membranei celulare, furnizînd ATP-ul necesar pompelor ionice (exemplu: pompa Na^+/Ka^+, pompa de Ca^{2+}). Circa 80% din mitocondriile situate în proximitatea membranei celulare realizează contacte strînse cu caveolele (vezi fig. 8.90).

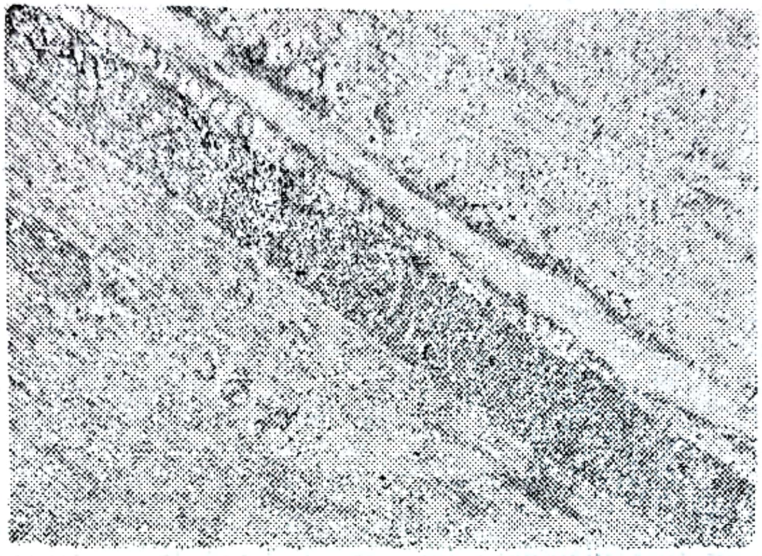


Fig. 8. 90. — Mitocondrie situată subsarcolemal, în relații strînse cu microveziculele de suprafață.

Aproximativ 1/3 din mitocondriile fibrelor musculare netede au în matricea lor așa-zise *granule dense* (granule matriceale), cu diametrul de 20—30 nm, care sînt intens opace la fluxul de electroni și în care nu se poate distinge o substructură (vezi fig. 8.90). Este posibil ca aceste granule intramitocondriale dense să fie depozite de ioni de calciu, care acumulați în exces în compartimentul intern mitocondrial să fi fost precipitați, spre exemplu ca fosfat de calciu.

8.4.2.6.2. Alte organite comune

Reticulul endoplasmic rugos este și el prezent în fibra musculară netedă) dar mai puțin bine dezvoltat decît reticulul endoplasmic neted (sarcoplasmic, (vezi: reticulul sarcoplasmic și cuplarea excitație-contracție). El este localizatl de regulă, în axul sarcoplasmic central al celulei. Tot în axul sarcoplasmic al celulei sînt și relativ numeroși *ribozomi liberi*. *Complexul Golgi* este situat în proximitatea nucleului și este slab dezvoltat, dar devine proeminent în cazu, orientării celulei spre sinteze. *Lizozomii* sînt rari în fibrele musculare netede. *Centrozomul* poate fi observat ocazional în vecinătatea nucleului, dispus într-o depresiune a învelișului nuclear.

Glicogenul apare pe imaginile electronomicroscopice sub forma unor granule electronoopace, izodiametrice, de cca 25 nm. Granulele de glicogen se găsesc fie izolate, fie agregate în adevărate „plaje", care pot apărea oriunde în celulă, cu excepția nucleului. Nu se cunoaște semnificația funcțională a agregării sau a păstrării individualității particulelor de glicogen. Uneori cantitatea de glicogen poate fi extrem de mare. Spre exemplu, în cursul gestației crește de aproximativ 50 de ori în fibra netedă uterină umană, ceea ce reprezintă o provizie de energie în vederea efortului contractil al travaliului.

8.4.2.7. Aparatul contractil

Deși în fibrele musculare netede există aceleași tipuri de proteine contractile (cu excepția troponinei, înlocuită de caldesmonă), organizarea ultrastructurală a aparatului contractil apare deosebită. În fibrele musculare netede se descriu *filamente subțiri de actină* și *filamente groase de miozină*, la fel ca în fibra musculară striată (al treilea tip de filamente, de 10 nm sînt de fapt citoscheletale), dar nu există benzi Z și M. În schimb, caracteristică pentru fibra musculară netedă este prezența așa-numiților *corpi denși* (vezi (fig. 8.83).

O chestiune importantă, nu numai de nomenclatură, este problema miofibrilelor din fibra musculară netedă. Din histologia clasică se moștenește și se perpetuează ideea existenței miofibrilelor în fibrele netede. Dar miofibrile ca atare, în sensul de pachete de filamente orientate paralel cu axul longitudinal al celulei și separate între ele prin spații intermiofibrilare (sarcoplasmice), nu au fost niciodată puse în evidență la microscopul electronic în fibrele musculare netede (după 30 de ani de microscopie electronică și sute de studii ultrastructurale). De aceea trebuie acceptat că *„miofibrilele netede" descrise în histologia clasică sînt artefacte*! În plus, trebuie subliniat și faptul că *în fibrele musculare netede nu există sarcomere*, ca în fibrele striate, neexistînd benzi Z.

8.4.2.7.1. Filamentele groase (de miozină)

Pînă de curînd (1977—1980) problema majoră nerezolvată în legătură cu organizarea ultrastructurală a substratului contractil din fibra musculară netedă a fost starea de existență a miozinei, deoarece, în condițiile standard de prelucrare a fragmentelor musculare pentru a fi examinate la microscopul electronic (prefixare în glutaraldehidă, post fixare în OsO_4), nu au putut fi puse în evidență filamente groase, asemănătoare celor din mușchiul striat. Astfel, se presupunea fie că miozina ar fi dizolvată în sarcoplasmă, fie că ar forma agregate moleculare cu un grad mic de polimerizare, neexteriorizabile electronomicroscopic sub formă de filamente groase, fie că, deși existente *in vivo*, filamentele groase ar fi „distruse" în cursul fixării și/sau al altor etape din tehnologia preparativă electronomicroscopică. La cealaltă extremă, s-a presupus existența miozinei din fibra netedă sub forma așa-numitelor „panglici de miozină", dovedite ulterior ca artefacte. Cercetări efectuate în anii '70 de Somlyo și colab. au dovedit însă că *(în anumite condiții experimentale)* pot fi puse în evidență cu regularitate, în fibrele musculare netede, filamente groase de miozină, asemănătoare celor din mușchiul striat. Actualmente

Scanned with OKEN Scanner

există un cvasiconsens în favoarea existenței filamentelor groase de miozină în mușchii netezi.

Molecula de miozină din fibra musculară netedă este asemănătoare, dar nu identică celei din fibra musculară scheletică, ambele fiind în ultimă instanță izoenzime. Greutatea moleculară, forma și dimensiunile moleculelor sînt comparabile, ca și alcătuirea din subunități (H-meromiozina și L-meromiozina). Principala deosebire constă în tipul de lanțuri ușoare, și ca urmare, activitatea ATP-azică a miozinei din fibra musculară netedă diferă de cea a miozinei mușchiului scheletic: afinitatea pentru ATP este mai mică și viteza de hidroliză a ATP-ului este și ea mai mică.

Caracteristicile filamentelor groase de miozină din fibra musculară netedă diferă de cele ale filamentelor groase de miozină din fibra musculară striată:

— *grosime* medie cca 15 nm (mai mare ca în fibra striată);

— *lungime* medie cca 2,2 micrometri (mai mare ca în fibra striată);

— *agregarea moleculelor* în cadrul filamentului pare deosebită (exemplu: nu există o zonă centrală fără punți transversale ca în mușchiul striat — vezi fig. 8.22 — deși aranjamentul punților transversale pe suprafața filamentului subțire este tot helicoidală).

Raportul cantitativ filamente groase/filamente subțiri este deosebit în fibra netedă față de cea striată. Dacă acesta este 1/2 în fibra striată, în fibrele musculare netede este apreciat la 1/8, 1/12 sau chiar 1/15. Este posibil ca aceste raporturi să reflecte variații în funcție de tipul de mușchi neted (exemplu: visceral sau vascular) sau de specie, dar totdeauna în mușchiul neted sînt (mult) mai multe filamente subțiri de actină în raport cu filamentele groase de miozină, față de mușchiul striat. Aranjamentul filamentelor subțiri în jurul celor groase este de asemenea deosebit în fibra netedă. Dacă acestea formează un model hexagonal în fibra striată (vezi fig. 8.15), în fibra netedă filamentele subțiri sînt descrise ca alcătuind rozete, orbite sau cabluri în jurul filamentelor groase. Nu se știe, deocamdată, dacă această dispunere este numai variată sau variabilă, sau dacă este artefactuală.

8.4.2.7.2. Filamentele subțiri (de actină)

Filamentele subțiri de actină din fibrele musculare netede sînt, din punct de vedere ultrastructural, asemănătoare celor din fibrele musculare striate. Grosimea lor este aceeași: 6—8 nm, dar lungimea pare variată. Asemănarea nu este întîmplătoare deoarece moleculele de actină și tropomiozină, care formează structura de bază a filamentului subțire (fig. 8.24), sînt similare.

Molecula de actină G, care formează unitatea de bază (monomerul) a filamentului de actină F, are aceeași greutate moleculară și același număr de aminoacizi în fibra netedă ca și în fibra striată. Există însă și unele deosebiri.

Dacă în fibrele musculare striate scheletice există numai actină alfa, în fibrele musculare netede actina este fie de tip alfa, fie de tip gamma. Actina alfa din fibra netedă diferă prin 8 aminoacizi de cea din fibra scheletică, iar cea gamma diferă prin 6 aminoacizi. Cele două tipuri de actină din fibrele netede (alfa și gama) diferă între ele prin 3 aminoacizi. Tipurile de actină prezente în mușchii netezi sînt:

— alfa, în mușchiul neted vascular;

— gamma, în mușchiul neted intestinal;

— alfa și gamma (în părți egale) în mușchiul neted uterin.

Scanned with OKEN Scanner

Molecula de tropomiozină din fibra netedă are aceeaşi greutate moleculară şi acelaşi număr de aminoacizi (284) ca tropomiozina din fibra striată. Cele 2 izoforme de tropomiozină (alfa şi beta) din fibra netedă diferă de izoformele din fibra striată doar prin cîţiva aminoacizi.

Raportul molar actină/tropomiozină este acelaşi ca în filamentele subţiri din fibra striată: 7 monomeri de actină G/1 moleculă de tropomiozină.

Filamentele subţiri din fibra musculară netedă nu conţin troponină (ca în fibra striată) ci caldesmonă, care joacă un rol analog complexului troponinic. Pe de altă parte, caldesmona nu există în fibra musculară striată scheletică.

Problema celui de al 3-lea component proteic al filamentelor subţiri din fibrele musculare netede. Notă istorică

După descoperirea troponinei în primii ani '60 de către Ebashi şi demonstrarea rolului ei în reglarea interacţiunii miozină-actină s-a crezut că *troponina* ar fi prezentă şi în filamentele subţiri din muşchii netezi. Astfel, Ebashi şi colab. (1966) şi Carsten (1971) au comunicat existenţa troponinei în muşchii netezi. Dar, un studiu fundamental al lui Bremel (1976) a arătat că troponina *nu* este prezentă în muşchii netezi şi acest studiu a fost ulterior confirmat de mai multe laboratoare. În „absenţa" troponinei din muşchii netezi au început căutările pentru „o altă proteină" cu rol analog troponinei. Din nou Ebashi şi colab. (1977) au proclamat descoperirea unei proteine specifice muşchilor netezi şi de aceea denumită *leiotonină*, ca echivalent al troponinei în muşchii netezi. Nici prezenţa leiotoninei nu a fost însă confirmată în anii următori de nici un alt laborator. Astăzi se ştie că aşa-zisa descoperire a leiotoninei s-a datorat contaminării extractelor proteice respective cu o proteinkinază (kinaza lanţului uşor al miozinei).

În 1981 Kakiuchi şi colab. au identificat în fibrele musculare netede proteina *caldesmonă* (denumită de la *calciu* şi *desmos* — în l. gr. = legare) şi actualmente este confirmat faptul că ea există şi reprezintă al 3-lea component proteic al filamentelor subţiri din fibrele netede, avînd un rol-cheie în reglarea acţiunii actină-miozină (Marston, 1985).

Caldesmona şi reglarea interacţiunii actină-miozină în fibra musculară netedă. Caldesmona este o proteină cu greutatea moleculară 150 000 prezentă în filamentele subţiri în proporţia: 1 moleculă de caldesmonă/4 molecule de tropomiozină/28 de monomeri de G-actină. Caldesmona este o proteină reglatoare, care combină proprietăţile troponinei I şi troponinei T din muşchiul striat (vezi fig. 8.26), în timp ce rolul troponinei C din mûşchiul striat este „preluat" în muşchiul neted de calmodulină. Caldesmona ar putea fi o formă ancestrală din care au evoluat troponina I şi troponina T.

În muşchiul în repaus (relaxat), cînd concentraţia intracelulară a Ca^{2+} este cca 10^{-7}M, caldesmona blochează interacţiunea actină-miozină. Cînd concentraţia intracelulară a Ca^{2+} creşte la cca 10^{-6}M, calmodulina leagă Ca^{2+}, devine activă şi se leagă de caldesmonă. Ca urmare, se produce o modificare de conformaţie în filamentele subţiri, ce permite interacţiunea actină-miozină, activarea miozinei, deci contracţia. Figura 8.91 prezintă comparativ cele două căi de activare a miozinei (declanşarea contracţiei) prin intermediul calmodulinei, dar cu etape intermediare diferite: fie prin caldesmonă (mecanism dependent de filamentele subţiri), fie prin kinaza lanţului usor al miozinei (mecanism independent de filamentele subţiri).

8.4.2.7.3. Elementele citoscheletale. Corpii denşi (leiozomii) şi filamentele intermediare

Corpii denşi sînt formaţiuni ultrastructurale (vizibili numai la microscopul electronic) strict specifice fibrelor musculare netede, de unde denumirea de *leiozomi* (L.M. Popescu, 1970, 1972). Pe imaginile electronomicroscopice ei apar ca nişte pete întunecate, mai opace la fluxul de electroni decît restul

Scanned with OKEN Scanner

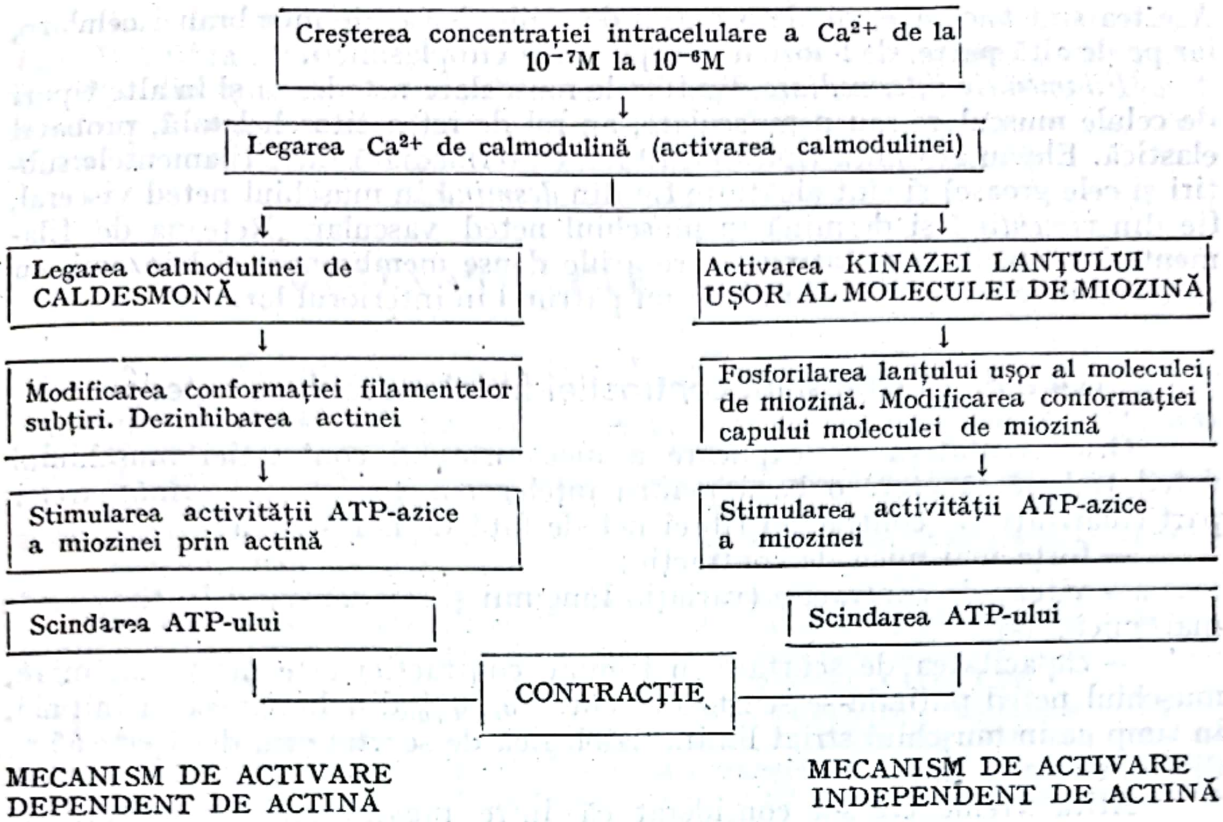


Fig. 8. 91. — Efectele creşterii concentraţiei intracelulare a Ca^{2+} de la 10^{-7}M la 10^{-6}M.

structurilor citoplasmatice. Leiozomii sînt distribuiţi relativ dezordonat printre miofilamente. Au formă alungită pe secţiuni longitudinale (lungimea pînă la 1 micrometru) şi subcirculară pe secţiuni transversale (diametrul 30—300 nm). În medie există cca 10 leiozomi/micrometru^2 de secţiune.

Din punct de vedere *ultrastructural* ei apar formaţi dintr-o aglomerare de *filamente subţiri de actină dispuse într-o matrice amorfă*, osmiofilă. La rezoluţii mari s-a putut surprinde existenţa unor *legături transversale* între filamentele de actină din interiorul leiozomilor. Dacă „intrarea" filamentelor subţiri de actină în corpii denşi este neîndoielnică, cei mai mulţi autori sînt de acord însă că filamentele intermediare stabilesc numai contacte cu ei, deci nu pătrund în interiorul lor.

Din punct de vedere al *compoziţiei chimice* este demonstrat neechivoc că leiozomii (corpii denşi citoplasmici) conţin *alfa-actinină* (Schollmeyer şi colab., 1976). De asemenea, se sugerează că ei ar conţine *filamină*. Ambele proteine sînt *proteine de gelare a actinei* (a filamentelor subţiri de actină) şi este posibil ca matricea amorfă a leiozomilor să fie alcătuită din alfa-actinină, iar legăturile transversale dintre filamentele de actină să fie formate din filamină.

Rolul leiozomilor este încă necunoscut. Formal, s-a presupus, începînd cu Lowy şi Hanson (1962), că ar fi structuri echivalente benzilor Z din fibrele musculare striate. Deşi acest punct de vedere îşi găseşte un suport în prezenţa alfa-actininei atît în benzile Z (vezi tabelul 8.VI) cît şi în leiozomi, el este totuşi superficial. Ceea ce se poate afirma deocamdată cu certitudine este faptul că leiozomii sînt formaţiuni citoplasmatice de ancorare a filamentelor subţiri.

Scanned with OKEN Scanner

Acestea sînt ancorate, pe de o parte, de ariile dense ale membranei celulare, iar pe de altă parte, de leiozomi (corpii denşi citoplasmici).

Filamentele intermediare din fibrele musculare netede, ca şi în alte tipuri de celule musculare sau nemusculare, au rol de reţea citoscheletală, probabil elastică. Ele au grosimea tipică de 10 nm (intermediară între filamentele subţiri şi cele groase) şi sînt alcătuite fie din *desmină* în muşchiul neted visceral, fie din *vimentină* şi desmină în muşchiul neted vascular. Reţeaua de filamente intermediare se întinde între ariile dense membranare şi leiozomi, cu care stabilesc o asociere clară, dar nu pătrund în interiorul lor.

8.4.2.8. Mecanismul contracţiei fibrei musculare netede

Orice tentativă de explicare a mecanismului contracţiei muşchiului neted trebuie să ofere o bază pentru înţelegerea a cel puţin următoarelor particularităţi ale contracţiei fibrei netede faţă de cea striată:

— forţa mai mică de contracţie;

— viteza de contracţie (variaţia lungimii şi/sau tensiunii în timp) este mai mică, iar

— capacitatea de scurtare în timpul contracţiei este mult mai mare, muşchiul neted putîndu-se scurta evident sub 50% din lungimea sa iniţială, în timp ce în muşchiul striat limita fiziologică de scurtare nu depăşeşte 65 % din lungimea sa iniţială.

Atîta vreme cît s-a considerat că între organizarea ultrastructurală a substratului contractil din fibra netedă şi striată există deosebiri importante (respectiv pînă în urmă cu cca zece ani, cînd s-a demonstrat prezenţa filamentelor groase de miozină în fibrele netede), se presupunea că mecanismul contracţiei ar trebui să fie diferit în muşchii netezi faţă de cei striaţi (exemplu: prin spiralizarea filamentelor).

Actualmente este general admis că mecanismul de generare a forţei care duce la dezvoltare de tensiune şi scurtare, constă, ca şi în muşchiul striat, în interacţiunea dintre filamentele de actină şi miozină prin intermediul punţilor transversale. O versiune *ad hoc* a mecanismului alunecării şi întrepătrunderii filamentelor subţiri printre cele groase, ca urmare a ataşării şi tracţiunii punţilor transversale, este considerată operaţională în fibra netedă. O particularitate importantă pentru fibra netedă ar fi faptul că *nu* toate punţile transversale ar realiza cicluri ataşare-detaşare de filamentele subţiri de actină ca în fibra striată. *O parte dintre punţile transversale sînt permanent ataşate* de filamentele de actină, ceea ce permite menţinerea unei tensiuni la cost energetic redus (Murphy, 1984), cu alte cuvinte, explică *tonusul* intrinsec al muşchiului neted.

Mecanismul pe baza punţilor transversale poate oferi şi explicaţii pentru alte particularităţi ale contracţiei fibrelor netede. Astfel, forţa mai mică de contracţie s-ar putea datora unui număr mai mic de punţi transversale decît în fibrele striate, deoarece, pe de o parte, cantitatea de miozină este mai mică în fibra netedă, şi implicit şi numărul de punţi transversale este mai mic, iar pe de altă parte, raportul filamente de actină/filamente de miozină este mai mare în fibra netedă. De aici rezultă că mai puţine punţi transversale trebuie să se ataşeze şi să tracţioneze mai multe filamente subţiri. Viteza mai mică de contracţie a fibrei musculare netede se poate atribui atît activităţii ATP-azice mai scăzute a miozinei, cît şi încetinelii cu care ea interacţionează

Scanned with OKEN Scanner

cu actina, de unde rezultă o rată de scindare a ATP-ului mai mică. În sfîrșit, faptul că fibra musculară netedă are posibilitatea de a se scurta la mai puțin de 50% din lungimea ei inițială, poate fi pus pe seama absenței benzilor Z, deoarece tocmai benzile Z sînt cele care împiedică, în condiții normale, scurtarea fibrei musculare striate sub 65% din lungimea lor inițială.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

BORG K. TH., CAULFIELD J. B. — The collagen matrix of the heart, *Fed. Proc.*, 1981, 40, 2 037—2 041.

CARAFOLI E. — The homeostasis of calcium in heart cells. J. *molec. cell. Cardiol.*, 1985, 17, 203—212.

DE GIROLAMI U., SMITH T. W. — Pathology of skeletal muscle diseases. *Amer. J. Pathol.*, 1982, 107, 235—276.

DICULESCU I. — On the unity of cytomembrane system in the skeletal muscle. *Morphol. Embryol.*, 1980, 24, 205—212.

DICULESCU I., POPESCU L. M.— Electron microscopic demonstration of calcium in mitochondria of the frog skeletal muscle in situ. *Exp. Cell. Res.*, 1973, 82, 152—158.

DICULESCU I., IONESCU N., POPESCU L. M. — Calcium immobilization in mitochondria of failing myocardium, *J. molec. cell. Cardiol.*, 1978, 10, 1 141—1 147.

DICULESCU I., POPESCU L. M., IONESCU N., BUTUCESCU N. — Ultrastructural study of calcium distribution in cardiac muscle cells. *Z. Zellforsch.*, 1971, 121, 181—198.

EISENBERG B. R.—Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. În: „Handbook of Physiology — Skeletal Muscle". Edited by American Physiological Society, Bethesda, 1983, p. 73—112.

GABELLA G. — Structure of smooth muscles. În: „Smooth Muscle. An Assessment of Current Knowledge", Arnold Books, Londra, 1981, p. 1—46.

GABELLA G. — Structural apparatus for force transmission in smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 1984, 64, 455—477.

GARFIELD R. E., SOMLYO A. P. — Structure of smooth muscle. În: „Calcium and Contractility: Smooth Muscle". Humana Press, Clifton, 1985, p. 1—36.

HALE C. C., SLAUGHTER R. S., AHRENS D. C., REEVES J. P. — Identification and partial purification of the cardiac sodium-calcium exchange protein, *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1984, 81, 6 569—6 573.

JAMES TH. N. — The sinus node. *Amer. J. Cardiol.*, 1977, 40, 965—986.

JAMIESON J. D., PALADE G. E. — Specific granules in atrial muscle cells, *J. cell. Biol.*, 1964, 23, 151—172.

LAMERS J. M. J. — Calcium transport systems in cardiac sarcolemma and their regulation by the second messengers. *Gen. Physiol. Biophys.*, 1985, 4, 143—154.

LIEBMAN J. — Are there internodal tracts? Yes! *Int. J. Cardiol.*, 1985, 7, 174—185.

MAC LENNAN D. H. și colab. — Amino-acid sequence of Ca^{+} Mg^{-} dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature*, 1985, 316, 696—700.

MANALAN A. S., KLEE C. B. — Calmodulin, *Adv. Cyclic Nucl. Protein Phosphoryl. Res.*, 1984, 18, 227—278.

MANJUNATH C. K., PAGE E. — Cell biology and protein composition of cardiac gap junctions. *Amer. J. Physiol.*, 1985, 248, 783—791.

MARSTON S. B., SMITH C. W. J. — The thin filaments of smooth muscles. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 1983, 6, 669—708.

MARTONOSI A. N., BEELER T. J. — Mechanism of calcium transport by sarcoplasmic reticulum. În: „Handbook of Physiology — Skeletal Muscle". Edited by American Physiological Societies, Bethesda, 1983, p. 417—485.

NEEDLEMAN P. și colab. — Atriopeptins: potential mediators of an endocrine relationship between heart and kidney. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1984, 5, 506—509.

PEARLMAN E. S., WEBER K. T., JANICKI J. S. — Quantitative histology of the hypertrophied human heart. *Fed. Proc.*, 1981, 40, 2 042—2 047.

PLAGHKI L. — Régénération et myogenèse du muscle strié, *J. Physiol. (Paris)*, 1985, 80, 51—110.

Scanned with OKEN Scanner

ȚESUTUL NERVOS ȘI SISTEMUL NERVOS

9.1. NOȚIUNI GENERALE

Acest capitol este consacrat structurii și funcției celui de al patrulea țesut fundamental al corpului omenesc — *țesutul nervos*.

Țesutul nervos are origine ectoblastică și este alcătuit din două tipuri de celule: elemente parenchimatoase specifice, celulele nervoase sau neuronii și elemente de susținere, celulele nevroglice.

Principalele elemente ale țesutului nervos, celulele nervoase sau *neuronii*, sînt celule specializate ale căror proprietăți fundamentale, *excitabilitatea* și *conductibilitatea*, sînt foarte bine dezvoltate pe seama pierderii capacității de a se înmulți (de aceea neuronii maturi nu mai pot să se dividă). Membrana celulelor nervoase este extrem de reactivă la stimuli, răspunsul său fiind generat instantaneu și transmis rapid, sub formă de valuri de excitație, cunoscute sub denumirea de *impulsuri nervoase*, care se propagă la distanță considerabilă în lungul *fibrelor nervoase* (prelungirile citoplasmei neuronale), extinse la mare distanță de corpul celular. Concepția actuală despre țesutul nervos a fost formulată în mod magistral, încă de la sfîrșitul secolului trecut, de celebrul histolog spaniol Ramon Y Cajal: „Les neurones sont des appareils générateurs et conducteurs de l'onde nerveuse. Voilà le fait fondamental!" (celulele nervoase sînt aparatul generator și conductor al undei nervoase. Iată faptul esențial!).

Toate celulele nervoase din corp sînt parte integrantă a organizării unui sistem unic, *sistemul nervos*. Sistemul nervos este un grup de structuri (organe sau elemente tisulare) interrelate funcțional, care îndeplinesc funcții speciale în organism și care sînt alcătuite din țesutul nervos. Organizarea și distribuirea țesutului nervos va putea fi înțelcasă mai ușor dacă vom trece mai întîi în revistă *evoluția sistemului nervos*.

9.1.1. FILOGENEZA

Datele de care dispunem sugerează că în cursul evoluției apariția celulelor musculare, la care este bine dezvoltată nu numai contractilitatea ci și excitabilitatea și conductibilitatea, precedă pe cea a celulelor nervoase și că

Scanned with OKEN Scanner

nițial celulele musculare se contractă ca răspuns direct la stimulii din mediul extern. Totuși, creșterea ulterioară în complexitate a organismelor viețuitoare necesită dezvoltarea *celulelor nervoase receptoare* la suprafață, sensibile la stimulii externi, care, prin transmiterea impulsurilor nervoase de-a lungul fibrelor nervoase, pot stimula contracția celulelor musculare chiar și atunci cînd acestea nu mai sînt prezente la suprafață. Următoarea etapă a evoluției este dezvoltarea *căilor nervoase*, unde impulsurile ce-și au originea într-un anumit neuron trec în altul la nivelul unor locuri de contact denumite *sinapse* (gr. *synapto* = a închide). Totuși aceste impulsuri nu se continuă în neuronul vecin în sensul strict al termenului; în realitate, la nivelul sinapsei cel de al doilea neuron este stimulat să declanșeze propriile sale impulsuri. Nu numai atît, în timp ce activarea unor sinapse declanșează nașterea unor noi impulsuri în cel de al doilea neuron, alte sinapse acționează în direcția prevenirii ca noi impulsuri să fie generate. Cea mai simplă cale nervoasă, constînd numai din doi neuroni, permite generarea de impulsuri ca răspuns la stimulii externi și apoi transmiterea ordinului de declanșare a contracției musculare ca răspuns la aceasta. Primul neuron este denumit *aferent* (lat. *ad* = la; *ferre* = a conduce) deoarece el conduce impulsul aferent (senzitiv) în interiorul corpului; cel de al doilea este denumit *eferent* (lat. *ex* = în afară) deoarece conduce *impulsul eferent* (motor) către fibrele musculare. Împreună, acești doi neuroni constituie cea mai simplă formă de *arc reflex*. La organismele multicelulare (inclusiv omul), ca urmare a evoluției, apare un plan de bază al construcției corpului alcătuit din segmente, fiecare din acestea cu proprii săi neuroni aferenți și eferenți și cu activități reflexe speciale care implică apariția de *neuroni intermediari* (sau neuroni de asociație) pentru a coordona activitățile neuronale autonome ale fiecărui segment al corpului. Apoi, evoluția continuînd, interneuronii devin mai abundenți și se aglomerează în axul corpului, unde încep să fie protejați de craniu și de vertebrele coloanei vertebrale. Acești neuroni devin foarte numeroși în regiunea capului, cuprinzînd cea mai mare parte a creierului. Segmentele individuale ale corpului sînt indicate de jumătățile adiacente ale vertebrelor, nervii spinali ai fiecărui segment pornind bilateral de la măduva spinării pe calea orificiilor (foramenelor) intervertebrale pentru a inerva țesuturile segmentului respectiv.

9.1.2. SISTEMUL NERVOS CENTRAL ȘI PERIFERIC

În mod convențional sistemul nervos este subîmpărțit morfologic în partea centrală și cea periferică. Partea sa principală, *sistemul nervos central* (SNC), constă din *creier* și *măduva spinării*, care provin din tubul neural. Cele mai importante roluri ale acestei părți a sistemului nervos sînt: integrarea și coordonarea stimulilor nervoși care sosesc sau se nasc, precum și realizarea funcțiilor mintale superioare ca înțelegerea, învățarea și memoria.

Sistemul nervos periferic (SNP). Cu toate că în limbajul curent este luat drept o entitate diferită, el este în fapt o continuare anatomică și operațională a SNC și trebuie considerat ca o extensiune periferică a acestuia. Diferitele sale părți componente sînt *nervii cranieni* aparținînd creierului și *nervii spinali* aparținînd măduvei spinării. Sistemul nervos periferic, așa cum vom arăta mai departe, se dezvoltă în principal din crestele neurale. Stimularea terminațiilor nervoase aferente declanșează impulsuri care se propagă pe calea

Scanned with OKEN Scanner

fibrelor sale aferente la SNC iar impulsurile eferente, provenite din SNC, se transmit pe calea fibrelor nervoase eferente la terminațiile nervoase de pe celulele contractile sau secretorii.

9.1.3. EMBRIOGENEZA

Sistemul nervos central își are originea în *placa neurală*, care se dezvoltă axial din ectodermul dorso-mijlociu al embrionului (fig. 9.1). Începînd cu ziua a 24-a această placă se invaginează rapid în lungul liniei mediane formînd un *șanț neural*. Marginile șanțului (pliurile neurale) fuzionează apoi dorsal pentru a forma *tubul neural* în ziua a 26-a a dezvoltării și, odată cu aceasta, unele celule ectodermale se detașează din tubul neural pentru a forma *crestele neurale* din care se vor dezvolta ganglionii și celelalte elemente ale sistemului nervos periferic. Tubul neural, ulterior, va da naștere creierului și măduvei spinării (vezi fig. 9.1).

Țesutul conjunctiv din organele sistemului nervos central se găsește în cantitate foarte mică, sub formă de țesut areolar foarte delicat care însoțește numeroasele capilare ce hrănesc țesutul nervos. Ca urmare, creierul și măduva spinării au o consistență moale și catifelată. Neuronii și prelungirile lor sînt totuși susținute de prelungirile celeilalte populații de celule a țesutului nervos (derivate din aceleași celule neuroectodermale), adică de către celulele gliale (gr. *glia* = a lega).

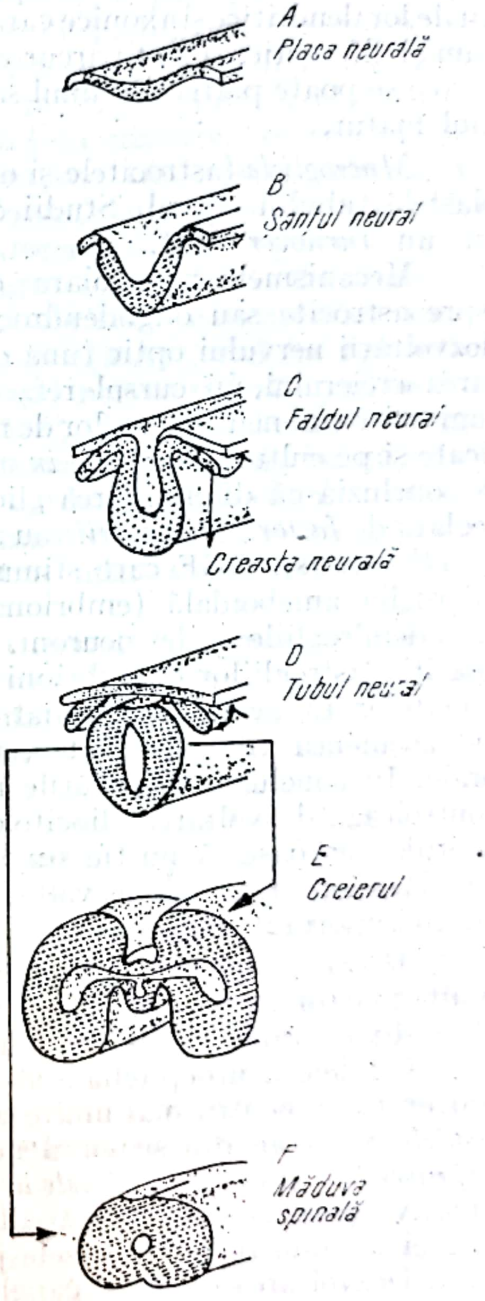


Fig. 9. 1. — Schema sumară a dezvoltării sistemului nervos.

9.1.4. HISTOGENEZA ȚESUTULUI NERVOS

Fenotipul specific neurogliilor sistemului nervos central derivă din *celulele progenitoare neuroepiteliale* ale tubului neural, după ce acestea au parcurs mai multe faze succesive ale unui proces complex de dezvoltare. Mai întîi, după ce tubul neural se închide, celulele neuroepiteliale își pierd toate contactele de tip *gap* cu celulele straturilor germinative învecinate (ectoblastice și mezoblastice), amplificîndu-se în schimb joncțiunile *communicans* proprii; de asemenea ele trec printr-un prim val de proli-

Scanned with OKEN Scanner

ferări de tip clonal, transformîndu-se în celule *neuroepiteliale stem pluripotente*. Astfel, prima fază a dezvoltării neuronale are drept rezultat apariția celulelor *stem* totipotente. În continuare celulele *stem* intră într-un al doilea val de diviziuni, denumite *mitoze de diferențiere*, ce constituie *faza de determinare*, de prediferențiere sau de angajare, avînd drept consecință transformarea celulelor *stem* totipotente fie în *neuroblaste precursoare*, fie în *glioblaste precursoare*, adică în celulele angajate în una din cele două linii. Celulele precursoare neuronale se transformă prin diviziuni în *neuroblaste* și, respectiv, în *glioblaste*.

Neuroblastele sînt celule mici, care au pierdut capacitatea de a se divide și intră într-o nouă fază de dezvoltare, *faza de diferențiere;* aceasta se continuă cu *faza de maturare* finalizată prin constituirea neuronilor maturi, cu prelungirile lor dendritice și axonice caracteristice. Prediferențierea sau angajarea, precum și diferențierea sînt parcurse fie pe loc, fie, de regulă, după procesul *migrării* (ce se poate petrece în unul sau două valuri) la locul pe care-l ocupă în stadiul matur.

Macrogliile (astrocitele și oligodendrocitele) derivă de asemenea din glioblastele tubului neural. Studii cu timidină tritiată sugerează că macrogliile au un *turnover* lent.

Mecanismele moleculare care controlează sincronizarea diferențierii (spre astrocite sau oligodendrocite) au fost identitificate *in vivo* în cursul dezvoltării nervului optic (una din cele mai simple părți ale SNC), în dezvoltarea creierului, în cursul refacerii leziunilor creierului și în unele tumori, cum este cazul neurinoamelor de nerv acustic uman. Datele obținute au fost verificate și pe culturi de celule *in vitro*. Aceste cercetări au condus în primul rînd la concluzia că diferențierea glioblastelor în cursul dezvoltării creierului este reglată de *factorii stimulării* sau ai creșterii gliocitelor desemnați ca GGF (*glial growth factors*). GGF care stimulează diferențierea astrogliei este secretat de microglia ameboidală (embrionară) iar GGF care stimulează diferențierea oligodendrogliilor, de neuroni. Există o corelație între prezența GGFas și apariția astrogliilor la embrioni și între prezența GGFol și apariția oligodendrocitelor în perioada imediat postnatală, în cursul dezvoltării creierului. De asemenea GGF-uri sînt secretați și în cursul vindecării leziunilor cerebrale. În concluzie, cercetările recente dovedesc că peptidele de tipul GGF controlează dezvoltarea gliocitelor în SNC. Cu toate că este posibil ca aceste peptide nervoase să nu fie singurele molecule care controlează diferențierea glioblastelor în cursul dezvoltării sau regenerării SNC, totuși acești factori au un important rol biologic.

Microgliile derivă din migrarea celulelor mononucleare sanguine, ca și alte macrofage din organism. Nu este clar însă dacă ele mai sînt capabile să se dividă după ce au ajuns la maturare în țesutul nervos.

Celulele neuroepiteliale ale *crestei neurale* (*CN*) sînt celule embrionare progenitoare pentru mai multe tipuri de celule la adult, incluzînd *neuronii* și *celulele Schwann* din sistemul nervos periferic, *melanocitele*, *celulele medulosuprarenalei*, precum și *celulele arcurilor branhiale* din care derivă celulele conjunctive și scheletale ale capului și feței. În timpul dezvoltării lor, celulele crestei neurale trec prin fazele pe care le parcurg și celulele tubului neural.

Dezvoltarea celulelor ganglionare [ale sistemului nervos periferic (SNP)] implică migrarea neuroblastelor din crestele neurale, la sediul viitorului ganglion și apoi diferențierea prelungirilor celulare care ajung la celulele-„țintă"

(celulele musculare netede, cardiace, receptorii senzoriali etc). În cel de al doilea val de mitoze sînt produse mai multe celule decît este necesar. Evident, acelea care nu stabilesc contacte funcționale cu țesutul -„țintă", degenerează și mor.

Celulele Schwann își au și ele originea în celulele crestei neurale, însă ele se divid în cursul dezvoltării nervilor. Multe din celulele Schwann se formează prin mitoza celulelor Schwann mature în nervii periferici și numai o populație relativ restrînsă provine din migrarea celulelor postmitotice ale crestei neurale.

Matricea extracelulară și histogeneza țesutului nervos. Au fost extrase din mediile în care au fost cultivate diferite tipuri de celule (ca de exemplu celule musculare cardiace, celule scheletale etc.), molecule capabile să afecteze diferențierea neuronală, să inducă ritmul de creștere a prelungirilor nervoase și să moduleze efectul factorilor neurotrofici asupra supraviețuirii celulelor nervoase. De asemenea migrînd *in vivo*, celulele crestei neurale migrează pe distanțe mari în lungul membranelor bazale, străbat matricea extracelulară și interacționează cu diferite elemente extracelulare. De aceea, celulele CN reprezintă un material favorabil pentru explorarea mecanismelor moleculare ale procesului de migrare și diferențiere neuronală.

Moleculele matricei extracelulare produse de cordul embrionului de pasăre, modulează supraviețuirea, dependentă de NGF a neuronilor simpatici cu toate că ele singure nu pot susține supaviețuirea celulelor respective. Într-o cultură de neuroni proveniți din sistemul nervos simpatic, adaosul de NGF nu permite supraviețuirea decît a 40—50% din neuroni; dacă această cultură de neuroni a fost condiționată prin tratarea prealabilă cu un mediu provenind de la culturile de celule musculare cardiace, supraviețuirea este de 100%. De asemenea, s-a putut constata că numai o anumită subpopulație de astfel de neuroni necesită prezența matricei extracelulare sintetizată de celulele cardiace pentru a supraviețui.

După cum se știe, matricea extracelulară cuprinde trei grupe de macromolecule, fiecare cu distribuție morfologică și, desigur, cu funcție specifică: colagenii, glicoproteinele (ca laminina și fibronectina) și proteoglicanii. Țesutul nervos conține o glicoproteină specifică, citotactina. Cercetări experimentale de biochimie și imunochimie au arătat că *celulele Schwann sînt sursa prezenței în membranele bazale*, formate în jurul fibrelor nervoase, a colagenilor, a glicoproteinelor (în principal a lamininei și citotactinei), precum și a *proteoglicanilor de tipul heparan-sulfatului*. Este de remarcat totuși, că formarea membranei bazale de către celulele Schwann poate avea loc *numai* în prezența celulelor nrvoase. Experiențe recente arată că celulele nervoase sînt necesare pentru menținerea unui nivel înalt de producere de către celulele Schwann a *colagenului de tip IV*, o componentă a membranei bazale. Agenții care previn formarea membranelor bazale, blochează diferențierea celulelor Schwann în stadii avansate, și anume formarea tecilor de mielină sau a învelișurilor nemielinice, în jurul fibrelor nervoase. Aceasta sugerează că membranele bazale joacă un rol important în dezvoltarea fibrelor nervoase periferice. Mecanismul acțiunii membranei bazale asupra celulelor Schwann nu este pe deplin înțeles.

S-a stabilit că celulele Schwann sintetizează două tipuri principale de *proteoglicani cu heparan-sulfat*. Se presupune că ambele tipuri au o proporție relativ redusă de carbohidrați față de componenta proteică. Dintre aceștia, proteoglicanii mai mari conțin lanțuri de heparan-sulfat și condroitin-sulfat

Scanned with OKEN Scanner

cu G. M. de 21 000 în proporție de circa 3:1. Acești proteoglicani se acumulează numai cînd celulele Schwann sintetizează activ membrana bazală. Proteoglicanii mai mici conțin lanțuri de heparan-sulfat și de condroitin-sulfat cu G. M. de 18 000 în proporție de circa 4:1. Acumularea acestor proteoglicani se petrece independent de elaborarea membranei bazale. Primul tip de heparan-sulfați sînt destinați organizării membranei bazale, iar cel de al doilea tip rămîn asociați cu membrana plasmatică a celulei Schwann.

În sfîrșit, s-a dovedit că *laminina* din membranele bazale are o acțiune atît de stimulare a activității neuritului, cît și de potențare a efectului de supraviețuire manifestat de NGF. Laminina este un excelent instrument pentru studiul interacțiunii membranelor celulare cu moleculele matricei intercelulare. Molecula de laminină poate fi ruptă proteolitic în fragmente față de care se pot produce anticorpi. Anticorpii față de cele trei ramuri scurte ale moleculei de laminină (vezi fig. 3.4) care constituie domeniul de care se leagă celulele tumorale și hepatocitele, nu blochează activitatea de stimulare a creșterii fibrelor nervoase și nici efectul de potențare al lamininei față de NGF. În schimb, anticorpii față de domeniul globular de la capătul ramurii lungi a moleculei de laminină (vezi fig. 3.4) suprimă atît creșterea neuriților cît și efectul stimulator al NGF. Anterior, s-a stabilit că proprietatea principală a extremităților globulare ale brațului lung al moleculei de laminină este aceea de a conține locuri de legare a moleculelor de heparină. Aceasta sugerează că laminina interacționează cu neurilema prin intermediul heparan-sulfatului. Faptul că au fost identificate *două tipuri de molecule de heparan-sulfat* (una în membrana bazală și alta legată de proteine integrale din membrana celulelor Schwann), precum și împrejurarea că molecula de laminină are două locuri de legare distincte (unul pentru membranele celulelor nervoase și altul pentru celulele nenervoase — ca celulele Schwann), acreditează posibilitatea ca laminina să medieze interacțiunile intercelulare în cursul dezvoltării sistemului nervos și al procesului de mielinizare. Cel puțin în procesul de regenerare a fibrelor nervoase periferice, laminina joacă un rol-cheie în controlul capacității de proliferare a neuritului în lungul tecii formate de celulele Schwann.

Celulele crestei neurale constituie un material de predilecție pentru studiul mecanismelor moleculare ale migrării celulelor nervoase. Desigur, migrînd *in vivo*, celulele crestei neurale (CN) utilizează mecanisme multiple de interacțiune cu moleculele ce compun membranele bazale și matricea extracelulară. Astfel s-a dovedit că celulele CN interacționează cu porțiunea peptidică a fibronectinei și nu cu fragmentele oligozaharidice. Fragmentul peptidic al fibronectinei se leagă de plasmalema celulelor CN și le inhibă proliferarea. Spre deosebire de acestea, moleculele de laminină interacționează cu celulele CN prin intermediul fragmentului oligozaharidic și nu prin porțiunea polipeptidică. Celulele CN utilizează galactozil-transferaza (Gal. T-aza) din componența membranelor lor plasmatice pentru a recunoaște N-acetilglucozamina (Glc NAc) din oligozaharidele moleculei de laminină. Migrarea celulelor CN este consecința disocierii catalitice a complexului Gal. T-ază/Glc NAc în prezența unui donor de galactază (de exemplu UDP-Gal.); astfel se eliberează enzima care devine disponibilă pentru ocuparea unui alt reziduu de Glc NAc și, ca urmare, celula se poate deplasa. Pe măsură ce neuronii și gliocitele ajung la maturare, interacțiunea dintre laminină și elementele nervoase se face prin intermediul heparan-sulfaților, așa cum am arătat.

Scanned with OKEN Scanner

Citotactina este o polipeptidă a matricei neuronale sintetizată de gliocite și alcătuită din trei subunități polipeptidice (de 220, 200 și 190 kD) legate între ele prin punți disulfidice. Apariția citotactinei în matricea extracelulară (MEC) a fost urmărită prin tehnicile imunohistochimice în cursul dezvoltării embrionului de pasăre. Cu toate că citotactina este considerată o moleculă care mediază interacțiunea glio-neurală, prezența ei fiind identificată și în faze inițiale ale dezvoltării embrionului, s-a sugerat că ea constituie o componentă a MEC mai larg distribuită, dar cu mult mai restrînsă decît fibronectina și laminina. S-a constatat că citotactina apare încă din faza de gastrulă a embrionului de pasăre. Ulterior ea este localizată în membrana bazală a tubului neural și a notocordului, întîi în regiunea cefalică, pentru ca apoi să se extindă caudal. După aceea apare în concentrație mare în crestele neurale și se extinde o dată cu migrarea celulelor CN; spre deosebire de fibronectină și de laminină, nu este prezentă însă în lamele mezodermice laterale și nici în ectoderm. Ulterior citotactina apare din abundență în sistemul nervos central și în cantitate mai mică în sistemul nervos periferic. La adult s-a dovedit că citotactina matriceală este concentrată în mare cantitate la nivelul nodurilor Ranvier (ale fibrelor mielinice) ca și N-CAM (moleculele adezivității neuronale din neurilemă) și Ng-CAM (moleculele adezivității neurogliale). Spre deosebire de aceasta, axonii amieliniei nu prezintă citotactină iar N-CAM și Ng-CAM sînt uniform repartizate. Înainte de mielinizarea fibrelor nervoase, citotactina este prezentă numai în celulele Schwann iar CAM — în fibrele nervoase. Pe măsură ce mielinizarea progresează, CAM și citotactina se concentrează la nivelul nodurilor Ranvier. În unele afecțiuni, cum sînt cele consecutive leziunilor plăcii motorii, deși CAM sînt prezente la nivelul nodurilor Ranvier (care se lărgesc), citotactina dispare. Trebuie amintit că nodurile Ranvier joacă un rol foarte important în transmiterea influxului nervos din fibrele mielinice, deoarece aici sînt concentrate canalele de Na^+ și ATP-aza de Na^+/K^+. Aceste date dovedesc că sincronizarea spațio-temporală a apariției la suprafața fibrelor nervoase a moleculelor adezivității celulare (CAM-urile) și a moleculelor adezivității din matricea extracelulară (exemplu a citotactinei) constituie o cale de reglare a proceselor de neurohistogeneză și de citodiferențiere. Aceasta înseamnă că moleculele matricei extracelulare și moleculele de adezivitate din membranele celulelor (respectiv CAM) apar în anumite locuri și la un anumit moment în cursul histogenezei.

Celulele crestei neurale au constituit și obiectul unor studii care au avut scopul să *determine evoluția diferitelor linii celulare*. Pentru aceasta au fost izolați anticorpi monoclonali cu care se marchează suprafața celulelor CN, denumiți anticorpi CN—1. Aceștia au fost folosiți pentru a urmări migrarea și pluripotența celulelor crestei neurale. Celulele *ne*-nervoase care derivă totuși din crestele neurale, cum este cazul melanocitelor și al celulelor mezenchimale din arcurile branhiale, *nu* sînt marcate de anticorpi CN—1, cu toate că ele par să derive din celulele precursoare ale crestei neurale care au fost pozitive la anticorpi CN—1. Aceste rezultate inițiale sugerează că *celulele crestei neurale devin heterogene*, adică *precursoare* (angajîndu-se pe o linie de evoluție sau alta) *numai după ce a fost inițiată migrarea celulelor stem*.

În ultimii ani au fost izolați și anticorpi monoclonali care marchează subpopulații ale celulelor CN. Astfel au fost izolați anticorpi specifici cu care se marchează o mică fracțiune din celulele din CN, care vor da naștere neuronilor ciliari. De asemenea, sînt în curs cercetări care privesc mai

multe tipuri de dezvoltare, inclusiv procesele premergătoare sintezei mielinei.

Asemănări și deosebiri între țesutul nervos și cel epitelial. Faptul că sistemul nervos derivă din ectoderm ne permite să atragem atenția că la maturitate el păstrează unele caractere morfologice generale ale epiteliilor. Astfel el este alcătuit în principal dintr-o masă de celule și din procesele acestora. Spațiul intercelular reprezintă o foarte mică proporție din volumul său. Ca și unele organe epiteliale, el este invadat de vase sanguine și de elemente conjunctive, însă, spre deosebire de organele epiteliale, parenchimul său este întotdeauna separat de vase și de foarte puținul țesut conjunctiv perivascular, de o lamă formată din prelungirile celulelor nevroglice și printr-o membrană bazală continuă.

În cele mai multe epitelii celulele au o *polaritate* distinctă datorită faptului că printr-o față stabilesc contacte cu țesutul vasculo-conjunctiv și cealaltă extremitate se află la suprafața liberă. În sistemul nervos central un vestigiu al acestei orientări primordiale este reprezentat de celulele ependimare care delimitează cavitățile cerebrale. De asemenea o astfel de polaritate o mai prezintă și unele celule nervoase receptorii, rămase la suprafața unor epitelii, cum este cazul celulelor olfactorii. Dacă, în cea mai mare parte a sistemului nervos, celulele parenchimatoase nu sînt orientate în raport cu reperele primordiale, în schimb ele sînt orientate una față de alta. Această diferență în orientare reprezintă o caracteristică foarte importantă a celulelor sistemului nervos central. În numeroase epitelii celulele sînt unități independente morfologic, trofic și *funcțional*, cu toate că posedă diferite mecanisme de joncțiune între ele. Spre deosebire de acestea, celulele sistemului nervos, cu toate că sînt și ele unități morfologice și trofice independente cu mecanisme joncționale similare, se comportă *funcțional profund interdependent*; și relațiile lor funcționale pot să se extindă pe distanțe lungi, prin intermediul unor circuite complexe de interrelații. Faptul că aceste conexiuni sînt ordonate precis — nu numai prin legături generale dintr-o parte în alta a sistemului nervos ci și prin dispozitive precise față de geometria fiecărei celule în parte — arată cît de profundă este transformarea celulelor embrionare de origine.

9.1.5. ȚESUTUL NERVOS

Așa cum s-a menționat, sistemul nervos este alcătuit în principal din țesutul nervos și dintr-o cantitate redusă de elemente conjunctive care însoțesc vasele sanguine.

Țesutul nervos este compus din două tipuri de celule: *celulele nervoase* și *celulele lor de susținere*. Celulele nervoase sau *neuronii* sînt unitățile funcționale ale țesutului nervos specializate pentru a primi și conduce informațiile, sub formă de impulsuri, în altă parte a sistemului nervos. Celulele nervoase sînt angajate într-o rețea comunicantă integrată și mai mulți neuroni dispuși în lanț sînt implicați în transmiterea informației dintr-o parte în alta a sistemului nervos. Contactele interneuronale sînt dispozitive structurale specializate în transmiterea informației de la un neuron la altul, denumite *sinapse*. Celulele care îndeplinesc rolul de susținere în țesutul nervos sînt *nevrlogiile* (sau simplu *gliile*) — în sistemul nervos central și *celulele Schwann* sau *celu-*

Scanned with OKEN Scanner

lele-satelite — în fibrele nervoase și, respectiv, în ganglionii sistemului nervos periferic.

Pe lîngă cele două componente celulare menționate, țesutul nervos mai conține și vase sanguine atît în sistemul nervos central cît și în cel periferic. Acestea sînt separate de elementele țesutului nervos prin interpunerea unei lame nevroglice și a unei membrane bazale iar în cazul vaselor de calibru mai mare, printr-o teacă conjunctivă perivasculară foarte fină. De mult timp, relațiile dintre vasele sanguine și țesutul nervos din sistemul nervos central sînt considerate ca avînd o organizare specială, deoarece unele substanțe „trasoare", care părăsesc patul sanguin cu ușurință pentru a pătrunde în parenchimul altor organe din corpul omenesc, nu pot pătrunde în țesutul nervos. Cu toate că elementele componente ale acestei bariere fac încă obiectul unor dispute între specialiști, restricția selectivă a trecerii substanțelor din patul sanguin în sistemul nervos central este o realitate, iar structurile ce participă la realizarea ei sînt denumite *barieră hematoencefalică* (vezi vascularizația cerebrală).

9.2. NEURONUL (NEURONUM SAU NEUROCYTUS)

9.2.1. STRUCTURA GENERALĂ A CELULEI NERVOASE

În sistemul nervos uman se apreciază că există 10^{10} — 10^{11} neuroni și de circa zece ori mai multe celule nevroglice.

Forma neuronilor ca semn al funcției lor. Celulele nervoase se disting printr-o remarcabilă varietate de forme și printr-o extraordinară diversitate de mărimi. Nici un alt tip de celulă, nici chiar plasticul macrofag, nu poate fi comparat cu forma extrem de complexă a celulei nervoase. Această organizare foarte complexă, sursa multor dificultăți pentru neurohistologi, este strîns legată de funcția neuronilor. În adevăr, Ramon Y Cajal afirmase că „forma celulelor, deoarece aceasta este expresia legăturilor dintre ele, este unul din cele mai importante atribute ale lor".

Pentru a identifica aceste legături, neurohistologii fac eforturi deosebite să descrie și să clasifice celulele nervoase din diferite regiuni ale sistemului nervos — aceste eforturi presupun o examinare tot mai amănunțită a mărimii, formei și dispoziției celulelor, a prelungirilor lor și a celor mai fine ramificații, a structurii lor interne ultramicroscopice, a ontogeniei și a evoluției lor. Corpul celulei nervoase ideale dă naștere la două tipuri de procese celulare denumite axon și dendrite. Fiecare celulă poate avea mai multe dendrite dar un singur axon. În timp ce marea majoritate a celuleor nervoase de vertebrate se conformează acestei paradigme, numeroase celule de nevertebrate nu o respectă, deoarece dendritele și axonii celulelor acestor specii de animale inferioare sînt dificil de deosebit.

De la primele studii ale lui Ramon Y Cajal, echipamentul standard al unei celule nervoase complet dezvoltate este considerat a fi compus din *trei părți principale* — corpul celulei, dendritele și axonul. De asemenea, conform doctrinei neuronale a lui Ramon Y Cajal, a devenit tradițional să împărțim celula nervoasă în diferite sectoare sau domenii funcționale. Celula nervoasă nu

Scanned with OKEN Scanner

este numai sediul producerii impulsului nervos; ca conducc acest impuls la distanțe lungi sau scurte, îl transmite la alte celule — nervoase, musculare sau glandulare — și este ea însăși capabilă să fie excitată sau inhibată de către stimuli direcți sau de către activitatea altor celule nervoase. Neuronul trebuie să posede aparatul necesar pentru generarea, recepționarea, conducerea și transmiterea impulsului nervos. Aceste funcții esențiale și caracteristice sînt localizate în diferitele părți componente ale celulei nervoase. Mai întîi trebuie spus că pericarionul (corpul celulei în care își are sediul și nucleul) este specializat ca centru metabolic și de sinteză al celulei. Acesta procură marea majoritate a proteinelor, utilizate în prelungirile celulare, deoarece dendritele au puține organite de sinteză iar axonii nu au aparatul necesar sintezei proteinelor. În plus, dendritele și corpul celular par specializate pentru primirea impulsurilor, în timp ce conul de emergență axonal și segmentul inițial al axonului sînt specializate în generarea potențialului de acțiune, care, apoi, este condus pe calea axonului la terminațiile nervoase. Acestea din urmă, la rîndul lor, sînt specializate în transmiterea impulsurilor la alte celule. Astfel celula nervoasă dispune de o *polarizare dinamică*. Aceasta a fost recunoscută pentru prima oară de Ramon Y Cajal și se reflectă în forma sa complexă, în dendritele nervoase care canalizează informațiile către un singur axon, componenta conductoare și transmițătoare a impulsului nervos.

În forma sa originală „legea polarizării dinamice" se referă la canalizarea energiei nervoase prin dendrite și corpul celular spre axon și de aici la transferul ei, mai departe , la dendritele și corpul celulelor vecine. Ca indicator al *direcției* fluxului informației prin celula nervoasă, această lege rămîne valabilă și astăzi, îndeosebi pentru acele celule nervoase care-și proiectează axonii la mari distanțe. Ea nu este însă conformă în mod riguros cu direcția impulsului nervos în microcircuitele nervoase, unde se aplică microfiziologia bazată pe polaritate.

În prezent, *polaritatea funcțională a celulei nervoase trebuie considerată consecința asimetriei sinaptice*. De aceea o examinare mai atentă arată că în numeroase celule nervoase, subdiviziunea morfologică tradițională în dendrite, corp celular și axon nu mai corespunde unor restricții funcționale corespunzătoare și, în unele cazuri, deosebirile morfologice și subdiviziunile acceptate clasic, nu se dovedesc valabile la nivel ultrastructural. Ca urmare, legea polarizării dinamice trebuie privită ca un principiu propedeutic, aplicabil la celula nervoasă ideală după modelul marilor celule nervoase motorii (cum este cazul celulelor piramidale din scoarță, al celulelor Purkinje din cerebel sau al celulelor motorii din coarnele anterioare ale măduvei spinării) și nu trebuie considerată ca o restricție nici a flexibilității celulei nervoase vii, nici a capacității noastre de a înțelege modul de construire operațional al sistemului nervos.

Ideea că forma celulei nervoase exprimă funcția, trebuie extinsă dincolo de principiul simplificator al polarității dinamice. Acest concept trebuie înțeles în sensul că forma celulei nervoase reflectă rolul său în sistemul nervos. Așa de exemplu, celulele ganglionului spinal, care au rolul de a recepționa de la exterior stimulii mecanici, termici sau de altă natură sub formă de impuls nervos și de a-i transmite fără pierderi sub formă de informații la alți centri nervoși, vor avea o formă corespunzătoare funcției în sistemul nervos, în schimb nu se vor încadra riguros în dogma polarității dinamice.

Neuronii se clasifică în general în trei categorii principale: *neuroni senzoriali*, care transmit impulsul de la receptori la sistemul nervos central; *neu-*

roni motori care transportă impulsul de la sitemul nervos central la celulele efectorii; și o vastă țesătură de *neuroni intermediari* (care se interpun între cei doi motori și cei doi senzoriali) denumiți și *interneuroni, neuroni internunțiali, neuroni intercalari* sau *neuroni centrali*. Se apreciază că circa 99,98% din totalul neuronilor constituie vasta țesătură intermediară.

În ciuda marii variații a formei și dimensiunilor, majoritatea neuronilor prezintă unele caractere structurale care permit identificarea a trei regiuni funcționale ale celulei: *corpul celular, dendritele* și *axonul*. Corpul celular conține nucleul și o mare concentrație de organite celulare. Dendritele și axonii sînt prelungiri ale corpului celular. Pe baza numărului de prelungiri prezente pe corpul celular, neuronii se clasifică astfel: *multipolari*, cu un axon și două sau mai multe dendrite; *bipolari*, cu un axon și o dendrită; *unipolari* (denumiți de asemenea și pseudounipolari), cu un axon care se divide în vecinătatea corpului celular în două ramuri lungi (fig. 9.2). Celule unipolare adevărate ar putea fi considerate doar celulele fotoreceptorii din retină care nu au dendrite, recepționînd direct, prin corpul lor, stimuli care sînt apoi transmiși prelungirii sale unice, axonul. Astfel de celule sînt însă excepții.

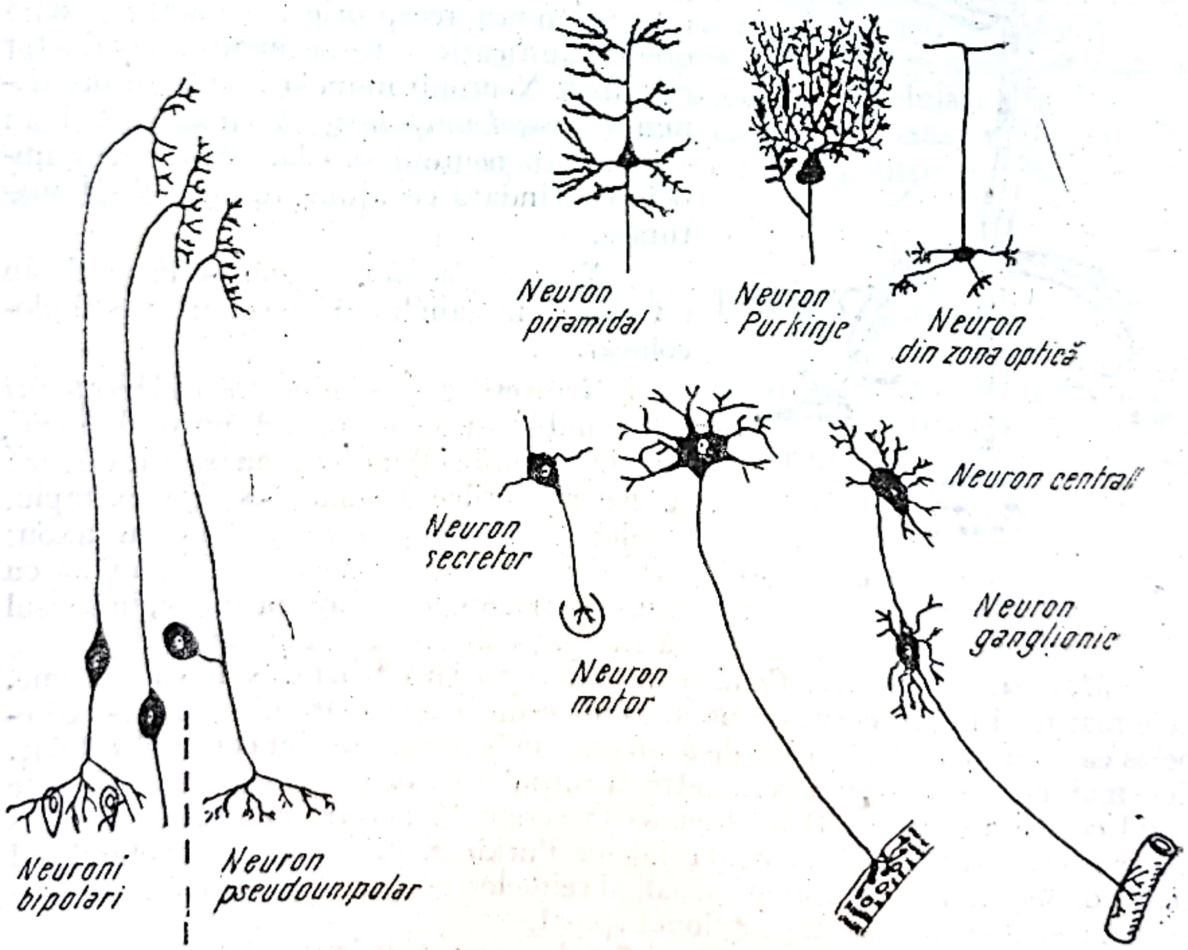


Fig. 9.2. — Diferite tipuri de neuroni.

Neuronii motorii și interneuronii sînt *multipolari* (fig. 9.3). În aceste celule (și trebuie reamintit încă o dată că aceste celule constituie marea majoritate a neuronilor din sistemul nervos) direcția fiziologică a impulsurilor este de la dendrite la corpul celular și apoi la axon sau de la corpul celular la axon. Așadar, din punct de vedere funcțional dendritele și corpul celular al neuronilor multipolari reprezintă sectorul receptor al celulei, și membrana plasmatică a acestui sector este special adaptată pentru generarea impulsurilor; axonul este porțiunea conducătoare a celulei și membrana sa plasmatică este specializată pentru conducerea impulsului; porțiunea terminală a axonilor este porțiunea „efectorie" sau transmițătoare a celulei, ce prezintă o extensiune terminală și mediatori chimici pentru transmisia sinaptică.

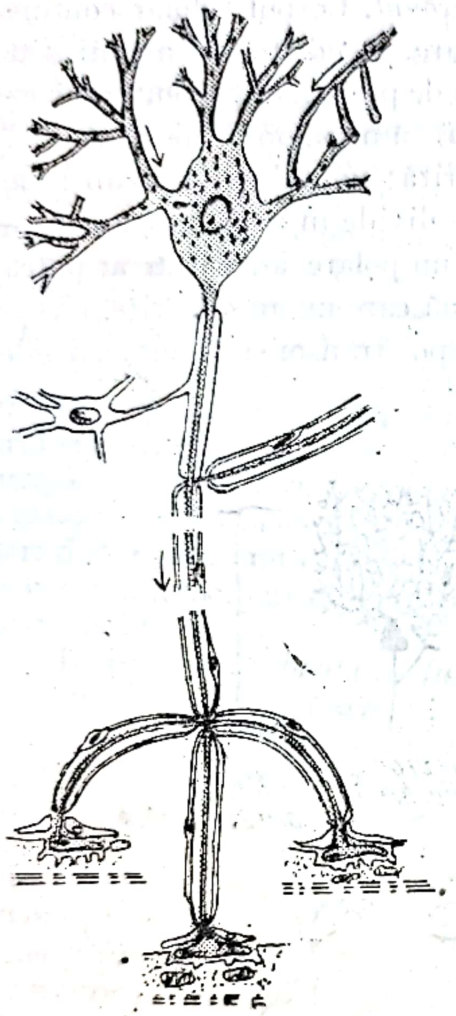


Fig. 9. 3. — Schema unui neuron motor.

Neuronii senzitivi sînt *unipolari*. Corpul celular al acestor neuroni este situat în ganglionii cranieni sau spinali, alăturați sistemului nervos central; prelungirea sa, după un scurt traiect, se divide într-o ramură care se extinde la exterior și o ramură care pătrunde în sistemul nervos central. Funcțional, impulsurile sînt generate în ramificația periferică a neuronului și această ramificație este porțiunea receptorie a celulei; cea de a doua ramificație este segmentul conductor celulifug. Neuronii unipolari sînt uneori denumiți *pseudounipolari*, deoarece ei își au originea în neuroni bipolari care devin unipolari de îndată ce ajung în stadiul de maturare.

Neuronii bipolari se găsesc la adult în retină și în ganglionii nervului vestibulocohlear.

Neuronii care se *asociază cu receptorii* unor simțuri speciale (gustul, mirosul, auzul, văzul și echilibrul) adesea nu se încadrează în generalizările de mai sus. De exemplu, celulele amacrine din retină nu au axon; *celulele* receptorului olfactiv se aseamănă cu neuronii sistemului neural primitiv, în sensul că rămîn localizate la suprafață.

Mărimea neuronilor. Celulele nervoase variază foarte mult ca mărime. Cele mai mici celule nervoase umane sînt celulele granulare din cortexul cerebelos care au diametrul în jur de *5—6 μm*, măsurat la nivelul corpului celular. Cele mai multe celule au un diametru al corpului lor de peste 100 μm. Așa este cazul corpului celulelor Betz din scoarța cerebrală motorie, al celulelor Deiters din nucleul vestibular lateral, al celulelor Purkinje, din soarța cerebeloasă, al celulelor Meynert din cortexul vizual, al celulelor gigante din formațiunea reticulară sau al celulelor din ganglionul spinal.

Trebuie subliniat că aceste evaluări dau o imagine incompletă asupra adevăratei mărimi a celulelor nervoase, deoarece ele reprezintă mărimea numai a

corpului celulei respective. Pentru cele mai multe celule nervoase, corpul neuronal, care este ușor de măsurat, reprezintă numai o mică proporție din cel al celulei întregi. Sînt celebre calculele făcute de Heidenhein în 1911 pentru a sublinia acest fapt. El a selecționat o celulă ganglionară spinală cu un diametru de 120 μm care avea un axon gros de 12 μm. Presupunînd corpul celulei ca fiind sferic, el a calculat că volumul acesteia ar fi de 864 000 μm^3, în timp ce axonul său, dacă ar fi lung de 1 m, ar avea un volum de 108 000 000 μm^3. Astfel corpul celulei ar reprezenta 0,8% din volumul total al neuronului. Chiar și în ipoteza că diametrul axonului este de 6,4 μm, volumul său ar fi de 32 000 000 μm^3 și el ar reprezenta de 35 de ori volumul corpului celular; corpul celulei ar fi 2,6 % din volumul total al neuronului. La extremitatea opusă, celulele cele mai mici au o proporție mai echilibrată a volumului corpului celular cu volumul total. De exemplu, celulele granulare din cerebel, al căror corp celular are diametrul de 6 μm iar axonul, diametrul de 0,2 μm și lungimea de 6 mm, au un volum al corpului celulei de circa 100 μm^3 și un volum al axonului de circa 180 μm^3.

Evaluarea suprafeței principalelor părți componente ale celulelor nervoase este și mai sugestivă. În cazul primului exemplu luat mai înainte, cel al celulei ganglionului spinal, de formă sferică, cu diametrul corpului celulei de 120 μm, corpul celulei are suprafața de 432 200 μm^2. Dacă axonul său are diametrul de 12 μm și lungimea de 1 m, suprafața sa este de 36 000 000 μm^2, adică de 837 de ori suprafața corpului celulei; dacă axonul este gros de 6,4 μm, suprafața sa este de 19 000 000 μm^2, adică de 441 de ori suprafața corpului celular. În cazul celulei granulare cerebeloase, al cărui corp are diametrul de 6 μm, suprafața sa este de 108 μm^2, în timp ce axonul (gros de 0,2 μm și lung de 6 mm) are suprafața de 3 800 μm^2, adică de 35 de ori cea a corpului celular.

Mărimea enormă a suprafeței neuronale datorită expansiunilor dendritice și axonale, subliniază importanța suprafeței celulare pentru funcția specifică a celulei nervoase.

9.2.2. CORPUL CELULEI NERVOASE

Corpul celulelor nervoase sau *soma* (*corpus neurocytis*) este partea neuronului care conține nucleul și citoplasma, exclusiv prelungirile (sau procesele) celulare. Acesta este centrul trofic al neuronului dar în același timp are și capa-

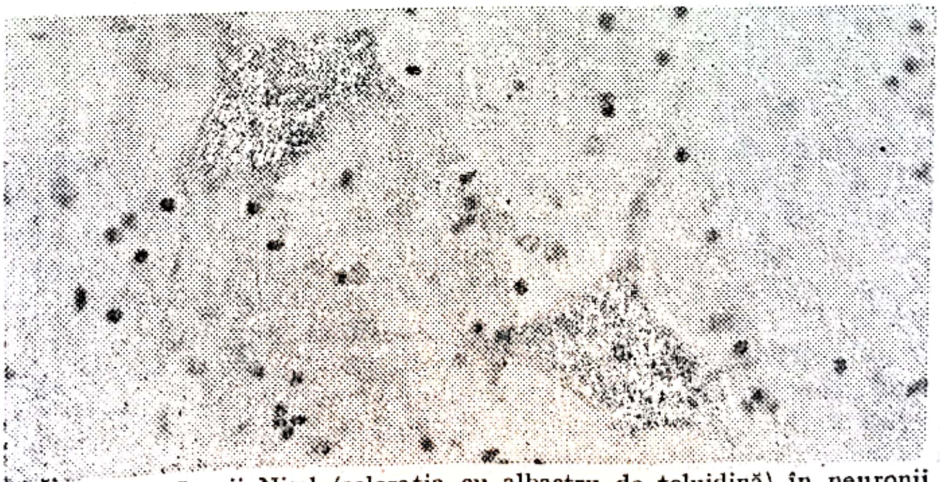


Fig. 9. 4. — Corpii Nissl (colorația cu albastru de toluidină) în neuronii motori din cornul anterior al măduvei spinării.

citate receptorie (fig. 9.3). Pericarionii unor neuroni primesc un mare număr de terminații nervoase care transmit stimuli excitatori sau inhibitori de la alte celule nervoase (fig. 9.4 și 9.5).

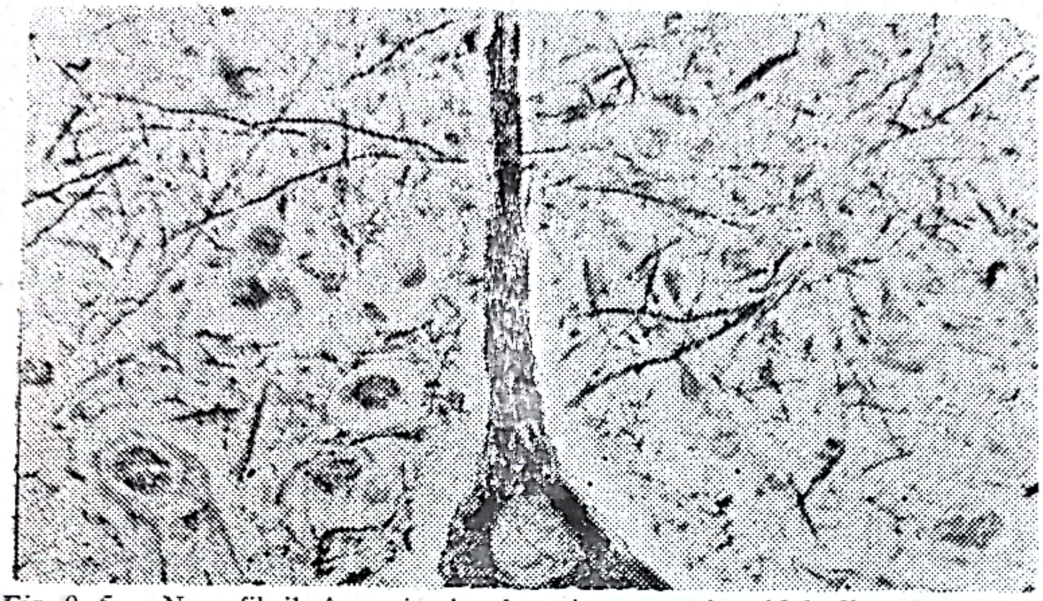


Fig. 9. 5. — Neurofibrile în pericarionul unui neuron piramidal din scoarța cerebrală (impregnare argentică).

9.2.1.1. Membrana

Membrana plasmatică a pericarionului are o organizare trilaminată de circa 7,5 nm și o compoziție *lipoproteică* similară cu membranele plasmatice întîlnite la celelalte tipuri de celule. Este caracteristică pentru membrana celulelor nervoase prezența unei bogate activități a unor enzime ca ATP-aza pentru Na^+ și K^+, precum și a 5'-nucleotidazei. De asemenea, în ultimii ani, au fost izolate prin electroforeză între 60 și 80 de tipuri de proteine din membrana celulelor nervoase, cu o greutate moleculară care variază între 14 și 200 kd. Deoarece numeroase proteine sînt glicoproteine, este foarte probabil că o parte importantă din acestea reprezintă receptori specifici care ne vor permite în viitor să identificăm diferitele tipuri de celule nervoase și eventualele lor reacții fiziologice sau patologice.

9.2.1.2. Nucleul

Majoritatea celulelor nervoase au un nucleu sferic, neobișnuit de mare, eucromatic (colorat palid), cu un nucleol foarte evident. De obicei nucleul este localizat în centrul pericarionului, cu excepția celulelor coloanei Clarke din măduva spinării ca și în unii ganglioni simpatici, unde se află localizați excentric. Cromatina este foarte fin dispersată reflectînd intensa activitate de sinteză a acestei celule. La femei, între nucleol și membrana nucleară internă se află o grămadă de heterocromatină, denumită *corpuscul Barr*. Aceasta este cromatina sexuală descoperită de Barr în celulele nervoase de pisică femelă și apoi identificată în toate tipurile de celule din corpul femelelor, inclusiv la femeie. Această cromatină reprezintă cromozomul X inactivat care rămîne condensat în interfază.

Scanned with OKEN Scanner

9.2.1.3. Reticulul endoplasmic rugos

Pericarionii conțin un reticul endoplasmic rugos foarte dezvoltat, organizat în agregate de cisterne paralele. În citoplasmă, între cisterne se află un mare număr de polizomi liberi care formează de obicei rozete; aceste celule sintetizează atît proteine structurale cît și proteine pentru transport. Cînd sînt folosiți coloranți speciali (coloranții anilinici, reacțiile pentru ARN), reticulul endoplasmic și ribozomii liberi apar la microscopul optic ca zone bazofile denumite corpii Nissl (vezi fig. 9.4).

Numărul și aspectul corpilor Nissl variază după tipul de neuron și după starea-funcțională. Ei sînt foarte abundenți în celulele nervoase mari cum sînt neuronii motori din măduva spinării.

Lezarea axonului sau epuizarea neuronilor provocată de stimuli prelungiți, determină o reducere și o periferizare a corpilor Nissl. Această alterare este denumită *cromatoliză* și survine simultan cu migrarea nucleului la periferie. Totuși, stimulii moderați și repetați au drept consecință creșterea ARN-ului din pericarion.

9.2.1.4. Aparatul Golgi

Aparatul Golgi este localizat numai în pericarion, în jurul nucleului. De obicei, aparatul Golgi studiat la microscopul electronic constă în principal din șiruri multiple de cisterne netede, dispuse paralel, sub forma mai multor grămezi așezate în jurul nucleului. Ele mai conțin, de asemenea, un număr de vezicule mici, sferice, care reprezintă atît vezicule de transfer cît și secretorii. Cîteva profiluri de reticul endoplasmic neted se pot observa în zona Golgi (fig. 9.6 și 9.7).

9.2.1.5. Mitocondriile

Sînt mici, ușor alungite, cu matricea densă și cu rare cisterne transversale. Mitocondriile sînt răspîndite în citoplasma întregului pericarion și în prelungiri, fiind deosebit de abundente în terminațiile axonale. Mitocondriile neuronale pot fi deosebite de cele ale altor țesuturi prin prezența unei proteine specifice.

9.2.1.6. Matricea

Citoplasma sau matricea neuronală este alcătuită din *citosol*, care cuprinde apă, electroliți și proteine solubile precum și din citoschelet (alcătuit dintr-o rețea de proteine insolubile) ale căror componente principale sînt neurofilamentele, neurotubulii și microfilamentele de actină și cele ale scheletului membranei neuronale, precum și din rețeaua *microtrabeculară*.

Citoscheletul matricei. Filamentele intermediare specifice, cu diametrul de circa 10 nm, intră în alcătuirea citoscheletului neuronal; ele sînt cunoscute sub denumirea de *neurofilamente*. Neurofilamentele sînt alcătuite din trei subunități proteice cu greutăți moleculare diferite. Axul microfilamentelor este constituit din cele două subunități proteice cu greutate moleculară mică (68 Kd și 145 Kd) iar subunitățile proteice mari (de 200 Kd) formează ramifica-

Scanned with OKEN Scanner

ții laterale. Neurofilamentele pot fi aglutinate, ca urmare a acțiuniii fixatorilor histologici, devenind vizibile la microscopul optic, îndeosebi după impregnare cu săruri de argint; ele sînt denumite *neurofibrile* (vezi fig. 9.5). Astfel, neurofibrilele nu reprezintă altceva decît neurofilamentele agregate de către agenții fixatori și colorate cu săruri metalice. În anumite condiții, neurofilamentele pot fi observate și în celulele vii, în culturile de celule. Aceasta este posibil datorită faptului că ele se grupează în fascicule paralele, apropiate strîns între ele, pentru că altfel grosimea fiecăruia dintre ele se află sub limita de rezoluție a microscopului optic. Șiruri de neurofilamente încrucișate traversează grămezile de reticul endoplasmatic rugos sau de polizomi și, ca urmare

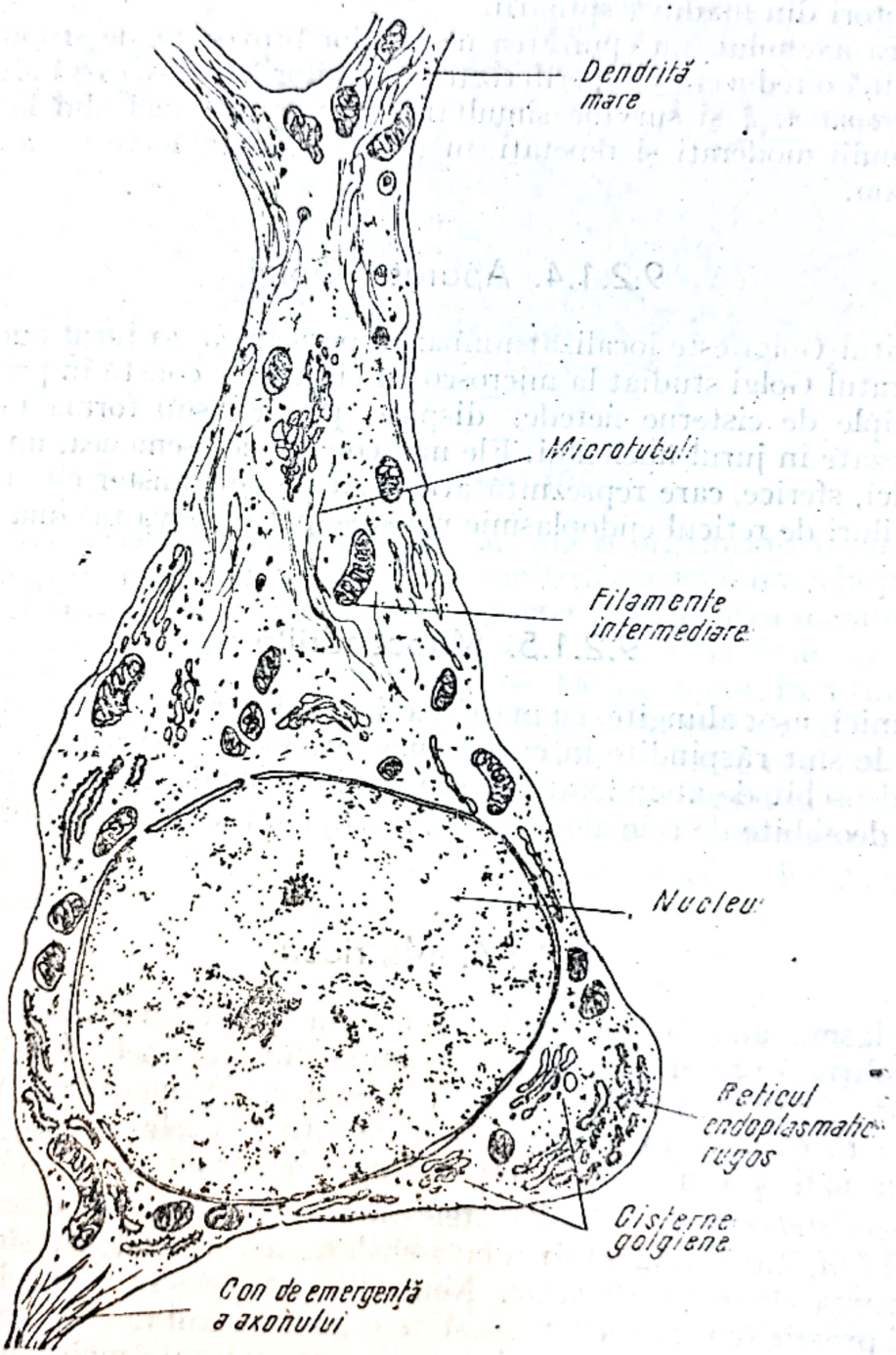


Fig. 9. 6. — Schema ultrastructurii pericarionului.

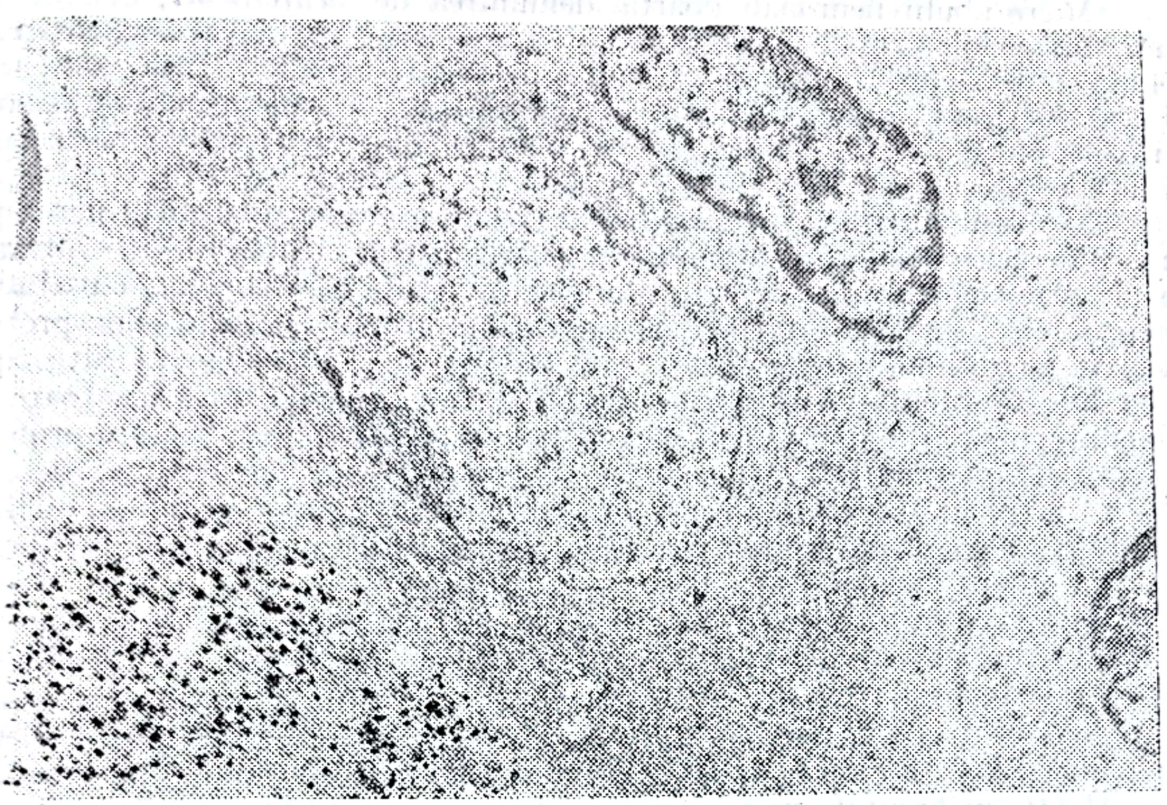


Fig. 9. 7. — Imagine electronomicroscopică a unui pericarion periferic (din medulosuprarenală) × 1 600: nucleul mare, situat central, cu cromatina de formă eucromatică și cu nucleol excentric. Citoplasma apare densă la fluxul de electroni, fiind bogată în organite. De o parte a celulei nervoase se remarcă o celulă-satelit cu citoplasmă puțină și cu nucleul heterocromatic. În jurul celulei se află numeroase terminații nervoase. În vecinătatea unui pol al celulei nervoase se remarcă peretele unui capilar. Pe o latură a neuronului se află celule secretorii noradrenergice.

fragmentează substanța bazofilă în grămezi discrete care se prezintă, după colorații corespunzătoare, sub aspectul „tigrat" al corpilor Nissl.

Neurofilamentele au fost identificate în cvasitotalitatea celulelor nervoase. Semnalăm unele variații cum este cazul absenței neurofilamentelor în celulele granulare ale scoarței cerebeloase sau al abundenței lor în axonii unor neuroni care contrastează cu numărul redus din dendritele celulelor respective. Subunitățile de 68 și 145 Kd sînt prezente în cantități aproximativ egale atît în axoni cît și în corpul celular și dendrite, iar cea de 200 Kd, îndeosebi în axon. Fiecare din subunitățile de 145 Kd și 200Kd se află în mai multe variante care diferă prin gradul lor de fosforilare; tipurile puțin fosforilate sau cele nefosforilate sînt prezente numai în corpul celular și în dendrite, în timp ce formele puternic fosforilate sînt prezente în axoni. Axonii mai conțin și o variantă specifică a subunității de 145 Kd.

Citoplasma neuronului cuprinde de asemenea diferite tipuri de complexe proteice în care proteinele majoritare sînt *tubulinele*, *actina*, *spectrina* și *proteinele asociate* lor. Acestea, spre deosebire de subunitățile proteice neurofibrilare (care în marea lor majoritate sînt organizate în neurofibrile citoscheletale), se află fie sub formă de subunități libere în citosolul celular (alcătuind „fondul de rezervă" din care se edifică, după nevoie, noi structuri citoscheletale), fie sub formă de elemente citoscheletale ca *neurotubulii* sau microfilamentele de actină și de *spectrină* din scheletul membranei neuronale.

Microtubulii neuronali poartă denumirea de *neurotubuli*; ei sînt asemănători cu microtubulii celorlalte tipuri de celule, au diametrul de aproximativ 24 nm și sînt alcătuiți din subunități de alfa- și beta-tubulină. Tubulina pare a fi egal distribuită în axoni ca și în corpul și dendritele unor anumiți neuroni. Tirozilarea tubulinei descreşte pe măsură ce celula și neuronii se maturizează și îmbătrînesc.

Neurotubulii joacă un rol esențial atît în extinderea și menținerea prelungirilor neuronale cît și în transportul organitelor citoplasmatice intraneuronale. Transportul organitelor în lungul microtubulilor are loc cu ajutorul unei proteine „translocator" (ce face parte din grupul așa-numitelor proteine asociate microtubulilor sau MAP), care are funcția ATP-azică. În alte tipuri de celule, proteina ATP-azică este dineina. Proteina translocatoare din celula nervoasă este diferită atît de miozină cît și de dineină. Această proteină, denumită *kinezină**, are un segment (o extremitate) care se leagă de organitul care trebuie transportat și o altă porțiune care interacționează ciclic cu microtubulii, pentru a produce translocarea mecanică a organitului în lungul neurotubulilor.

Proteinele asociate microtubililor sau MAP (microtubule associated proteins) pot fi sistematizate după greutatea moleculară în două grupe mari: *a*) MAP cu greutate moleculară mare între 240 kD și 350 kD și *b*) cu greutate moleculară joasă, între 55 kD și 80 kD. Primul grup cuprinde trei membri — MAP_1, MAP_2 și MAP_3 — care sînt biochimic, imunologic și topochimic distincte.

MAP_1 cu greutate moleculară ce depășește 300 kD, este alcătuită din trei subunități, și anume: MAP_{1a}, MAP_{1b}, și MAP_{1c}. Se găsește în axonul inițial, în pericarionul și în arborele dendritic al celulelor Purkinje; este puțin proeminent în celulele granulare și lipsește din gliocite; răspunde la inducția NGF. MAP_1 este de circa 500 de ori mai abundentă în celulele nervoase față de hepatocite, celulele din stomac, din splină și din timus.

MAP_2 are greutatea moleculară de 250—300 kD, este alcătuită din două subunități distincte — MAP_{2a} și MAP_{2b} —, este prezentă în principal în dendrite — în cantitate mică în corpul neuronal și absentă în axonii neuronali și din gliocite. Proteina, specifică celulelor nervoase, nu a fost identificată în alte tipuri de celule. Molecula se prezintă ca un bastonaș foarte flexibil, lung de circa 180 nm și cu o extremitate globuloasă.

Subunitățile MAP_1 și cele ale MAP_2 sînt codificate de cîte o singură genă.

MAP_3 are greutatea moleculară mai mică de 250 kD, este prezentă îndeosebi în axonii băgați în neurofilamente (de exemplu în fibrele mielinice) și în prelungirile celulelor „în coșuleț". Spre deosebire de MAP_1 și MAP_2, MAP_3 se află atît în neuroni cît și în gliocite.

Grupul MAP cu greutate moleculară mică este compus din *tau* care au 55—62 kD și din *cartine* care au 64, 67 și 80 kD. Această categorie de MAP-uri este alcătuită din subunități de greutăți moleculare ușor diferite, al căror grad de fosforilare este controlat de NGF.

Fiecare neurotubul (NT) se află plasat în propriul său cilindru de influență, descris ca „cilindru de delimitare NT". Periferia unui cilindru tinde să se asocieze cu periferia cilindrului alăturat, ca și cu suprafața internă a plasmalemei sau a organitelor membranare. Acești „cilindri" în condiții normale sînt clari la fluxul de electroni însă componenta lor filamentoasă poate fi colo-

* *Kinein* (gr.) = a mișca.

rată cu unele metale grele în țesuturile nervoase. S-a sugerat că MAP care acoperă suprafața NT sînt responsabile de volumul cilindrului de delimitare a NT. Diametrul cilindrului de delimitare NT variază. Astfel distanța dintre neurotubulul ganglionului spinal este de 75 nm iar cea dintre NT dendritelor celulelor ganglionare din retină, de 94 nm. Aceste diferențe depind de faptul că MAP variază ca mărime (G.M., tip etc.) de la un tip de neuron la altul și în același neuron, de la o regiune la alta. Mai important este faptul că diametrul acestui cilindru rămîne constant în cursul diferențierii neuritului sau dendritelor unui anumit tip de neuron.

Citoscheletul membranei este alcătuit dintr-o rețea în care componenta principală este reprezentată de moleculele de *spectrină*. Aceste molecule au forma unor bastonașe cu grosimea de cca 5 nm și lungimea de 100 nm. La nodurile rețelei formată de spectrine se află moleculele de *anchirină* (denumite și sindeină) sau proteinele benzii 4,1, cuplate cu mici fragmente de actină. Celulele nervoase conțin cel puțin două tipuri de *spectrine* (proteine din citoscheletul membranei): o *spectrină eritrocitară* (SE) și o *spectrină neeritrocitară sau neuronală* (SN) care mai este denumită și *fodrină*. Ambele tipuri de spectrine sînt proteine fibroase cu greutatea moleculară de circa 1 milion, alcătuite din subunități de 240 kD (alfa) și de 235 kD (beta) care formează un complex tetrameric $(alfa, beta)_2$.

Subunitatea alfa conține un loc de legare a calmodulinei, în timp ce subunitatea beta fosforilată conține un loc pentru legarea *sindeinei* sau *anchirinei* cerebrale prin intermediul căreia se ancorează de plasmalemă. Celelalte proteine ale citoscheletului membranei neuronale — *proteina 4,1* și *f-actina* — se leagă de ambele capete ale tetramerului spectrinic, ele constituind punctele de legătură dintre citoscheletul membranei neuronale cu citoscheletul matricei. În consecință, citoscheletul membranei neuronale este alcătuit dintr-o rețea de spectrine ancorată, pe de o parte, de plasmalemă prin intermediul anchirinei și, pe de altă parte, de citoscheletul matricei neuronale prin intermediul proteinei 4,1, a f-actinei și MAP_2. De fapt, microfilamentele și neurotubulii matricei neuronale se ancorează în mănunchiuri relativ omogene pe citoscheletul membranei. Ca urmare, în citoscheletul membranei se constituie două subdomenii de conexiuni cu citoscheletul matricei, în formă de pată: în unele predomină microtubulii iar în altele, microfilamentele matriceale.

Cele două tipuri de spectrine ale citoscheletului membranei neuronale segregă în neuronul matur, în sensul că spectrina de tip eritroid este restrînsă la citoscheletul membranei corpului celular și al dendritelor, în vreme ce fodrina este transportată în axon intrînd în alcătuirea scheletului membranei acestuia și îndeosebi în membranele presinaptice. Este probabil ca cele două tipuri de spectrine să joace un rol important în polarizarea funcțională a celulei nervoase, ele determinînd la rîndul lor, polarizarea unor proteine integrale membranelor plasmatice neuronale din *domeniul receptor* sau postsinaptic și respectiv în cel *transmițător* sau presinaptic. Aceasta ar putea fi în legătură cu distribuirea în plasmalemă a canalelor și pompelor ionice.

Citoscheletul membranei și cel al matricei împart neuronul în microdomenii deoarece există numeroase diferențe în concentrația și în topografia componentelor sale. Astfel, pe lîngă diferențele semnalate în repartiția spectrinei eritrocitare și a fodrinei subunităților neurofilamentelor și a tipurilor de MAP, s-au mai identificat și trei tipuri de proteine 4,1 (o formă pentru dendrite și corpul neuronal, alta pentru axon și una specială pentru terminația presi-

Scanned with OKEN Scanner

maptică), alfa- și beta-tubuline izoforme, și diferite forme izotipice de actină (îndeosebi în postsinapse). De aceea este important de reținut că dendritele și corpul celular reprezintă un domeniu neuronal distinct și că citoscheletul corpului celular, ca și cel al dendritelor diferă atît de la un neuron la altul cît și față de axonul propriu.

Fosfoproteinele. Cea mai mare parte din proteinele ce alcătuiesc matricea neuronală (atît citoscheletul cît și citosolul) sînt *fosfoproteine.* Cercetările din ultimii circa 20 de ani au dovedit foarte clar că aproape toate procesele biologice celulare sînt reglate pe calea fosforilării proteinelor. Enzimele-cheie în procesele de fosforilare și defosforilare a proteinelor sînt *proteinkinaza* și respectiv *proteinfosfataza.*

În ultimii ani cîteva grupuri de cercetători, și în mod special cel al lui P. Greengard (de la Facultatea de Medicină a Universității Rockefeller din New York) au făcut progrese importante în izolarea și caracterizarea fosfoproteinelor din creierul mamiferelor, precum și în elucidarea efectelor neurotransmițătorilor asupra acestor importante molecule ce intră în alcătuirea citoplasmei.

În esență, cercetările din ultimii ani au dovedit: *a*) că proteinele care se fosforilează ca urmare a acțiunii neurotransmițătorilor din creier sînt un grup foarte divers, cu mult mai divers decît ceilalți participanți la răspunsul neurotransmițătorilor; b) că reacția specifică a unei anumite celule nervoase la neurotransmițător depinde probabil în mai mare măsură de tipul de proteină fosforilată decît de alte componente ale mașinăriei reglatoare; *c*) că fosfoproteinele pot servi ca *marker*-i pentru identificarea diferitelor tipuri funcționale de celule sau de traiecte nervoase și că ele sînt ținta potențială a drogurilor psihotrope. Pînă la începutul anului 1985, numai grupul lui Greengard izolase și caracterizase parțial circa 70 de tipuri diferite de fosfoproteine neuronale și cercetătorii presupuneau că există mii în sistemul nervos central.

Cercetările recente au dovedit că substratul proteic neuronal diferă foarte mult în privința kinazelor prin care sînt fosforilate, în privința proprietăților moleculare, prin funcțiile lor și în fine prin localizarea lor intracelulară sau după tipul de celulă. Unele fosfoproteine sînt prezente virtual în toate tipurile de neuroni, în timp ce altele se află numai în cîteva tipuri sau într-un anumit tip. Aceasta determină o uimitoare *heterogenitate biochimică a neuronilor.* În consecință, în opoziție cu concepția de pînă acum, după care neuronii ar fi foarte asemănători unul cu altul din punct de vedere biochimic, cercetările recente dovedesc că celulele nervoase sînt extrem de diverse și cu această diversitate nu se limitează la aspectul morfologic ci se extinde și la organizarea biochimică.

Existența unor celule nervoase foarte deosebite ca tip biochimic are implicații în selectivitatea drogurilor neuroactive. A devenit probabil să se producă droguri care să stimuleze sau să inhibe în mod specific funcția substratului proteic al unei kinaze într-un anumit tip de neuron sau, cel puțin, în cîteva tipuri de neuroni. Astfel de droguri ar putea fi mai specifice ca acțiune decît acele medicamente care acționează asupra unor substanțe mai larg răspîndite cum sînt kinazele sau neurotransmițătorii, care au ca țintă un spectru mai larg de celule nervoase.

Noul grup de droguri include ca obiect familia de fosfoproteine care au fost identificate ca fiind implicate în maladia Parkinson și în maladia Hunti-

Scanned with OKEN Scanner

ngton. În prezent a început producția industrială de droguri care acționează direct asupra fosfoproteinelor.

Unele tipuri de fosfoproteine, îndeosebi acelea care sînt prezente în anumite tipuri de celule nervoase, s-au dovedit utilizabile pentru a identifica anatomia legăturilor nervoase. Așa, de exemplu, a putut fi alcătuită o hartă precisă a distribuției conexiunilor celulelor Purkinje ale cerebelului (care transportă semnale de la cerebel, intervenind în coordonarea mișcărilor) în sistemul nervos central. Identificarea unor *marker*-i specifici, cum sînt fosfoproteinele, poate facilita foarte mult cartarea legăturilor interneuronale și sînt deosebit de utile pentru urmărirea comportării neuronilor în cursul dezvoltării.

Identificarea locurilor de distribuție intracelulară sau subcelulară a fosfoproteinelor oferă indicații-cheie asupra funcției lor. Pînă în prezent, cercetările s-au concentrat asupra a două fosfoproteine, sinapsina I și DARPP-32 (denumire prescurtată de la *„dopamine and cyclic AMP — regulated phosphoprotein"*, cu greutate moleculară de 32 000).

Sinapsina I este o fosfoproteină neuronală cu greutate moleculară de 83 000 daltoni. Se pare că ea este o variantă specială a proteinei 4,1 din citoscheletul de membrană, concentrată în terminația axonică. În speță, sinapsina I acoperă suprafața veziculelor sinaptice.

DARPP—32, mai restrîns repartizată decît sinapsinele, este prezentă doar în unii neuroni care răspund la dopamină, respectiv doar în neuronii care conțin receptorul D_1, nu și în cei care conțin receptorul D_2.

Proteinele din citosol. Așa cum reiese din cele afirmate pînă acum, o parte din subunitățile citoscheletului (tubulinele, MAP, actina G) fosfoproteinelor sau proteinkinazelor, se află în citosol în anumite stadii funcționale. Pe lîngă acestea, citosolul mai cuprinde și alte tipuri de proteine solubile cum sînt proteinele *similare proteinelor „Alz 50"* sau *inhibitorul legării diazepinelor*. Subliniem că acestea constituie un grup de proteine *foarte diverse*, în plin proces de descoperire (cele două proteine pe care le prezentăm în continuare trebuie considerate cu titlu de exemplu), prezente în *concentrații foarte reduse* (ceea ce a întîrziat identificarea lor), avînd ca însușire generală *modulabilitatea*, adică proprietatea de a fluctua atît cantitativ cît și calitativ.

Recent (vezi *Science*, 1985, *230*, 1 260) au fost identificate două tipuri de *proteine solubile*, care se află în cantități foarte mici în citosolul neuronilor normali și care dau reacții imunologice similare cu proteina cunoscută sub codul *„Alz* 50", specifică pentru leziunile neuronilor din demența de tip Alzheimer. Leziunile caracteristice în patologia cerebrală de tip Alzheimer sînt reprezentate de *plăcile neuritice* și de *spiralele fibrilare*, prezente îndeosebi în citoplasma neuronilor din *hipocampus* din cortexul temporal și din *nucleus basalis*.

Este știut de mai mult timp că tioflavina S este un *marker* fluorescent cu care se identifică plăcile și spiralele din maladia Alzheimer dar care nu colorează nimic în neuronii normali. Cercetările din ultimii ani au dovedit că substratul molecular — atît al plăcilor cît și al spiralelor din leziunile Alzheimer — este reprezentat de un complex de proteine foarte greu solubile și din proteine solubile. Proteinele insolubile stau la baza organizării ultrastructurale a leziunilor respective. Așa de exemplu, la microscopul electronic, spiralele fibrilare se dovedesc a fi alcătuite din snopi de *filamente perechi înfășurate în spirală* una față de alta (pasul de răsucire a filamentelor este de circa

65—80 nm, cu distanțe de circa 27—34 nm, la bucla mare și de 10—15 nm, la bucla mică). Proteinele „Alz 50" impregnează filamentele spirale (de proteine insolubile), ele au o greutate moleculară de 68 Kd, sînt foarte solubile și foarte ușor degradate de tripsină.

Anticorpii anti-„Alz 50" recunosc circa 95% din plăcile neuritice și spiralele fibrilare colorate cu tioflavina S; acești anticorpi marchează de asemenea și plăcile din creierul pacienților de vîrstă înaintată cu sindromul Down ale căror simptome neuropatologice sînt asemănătoare cu cele din maladia Alzheimer.

Circa 10 procente din celulele marcate cu anticorpii anti-„Alz 50" nu se colorează cu tioflavină S. Este posibil ca aceștia să fie neuroni în care ulterior se vor constitui plăci și spirale neuritice. Pe de altă parte, poate fi luată în considerație și posibilitatea ca proteina solubilă din plăcile și spiralele Alzheimer să aibă segmente de aminoacizi similare cu proteinele solubile din celulele normale și ca aceste secvențe comune să fie responsabile de marcarea cu anticorpi anti -„Alz 50" a celor 10% din celulele care nu se colorează cu tioflavină S. Elucidarea celor două alternative interesează histopatologia celulei nervoase umane.

Prezintă de asemenea un interes deosebit identificarea, izolarea și localizarea (*Science*, 1985, *229*, 179—182) unei *neuropeptide*, care a fost denumită *inhibitorul legării diazepamului* sau DBI (*diazepam-binding inhibitor*) pentru a indica însușirea sa de a disloca ligandul endogen specific pentru recunoașterea diazepinelor. Această neuropeptidă este alcătuită din 104 reziduuri de aminoacizi, între care se află integrate două octapeptide cu o succesiune identică de aminoacizi. DBI funcționează probabil ca un precursor al acestor octapeptide care reprezintă adevărați liganzi endogeni pentru recunoașterea benzodiazepinelor. Așadar, DBI este un precursor al unei noi familii de neuropeptide — el antrenează un răspuns proconflictual (*Neuropharm.*, 1984, 23, 1 359) cînd este injectat intraventricular la șobolan — și este localizat în neuronii din diferiți nuclei ai hipotalamusului, precum și din scoarța cerebrală, cerebeloasă sau limbică.

Inhibitorul legării diazepamului a fost izolat atît din creierul de șobolan cît și din cel uman. În conformitate cu presupusul său rol de precursor, DBI poate fi vizualizat (prin imunoreacții) în corpul neuronal atunci cînd transportul axonal este inhibat prin administrarea de colchicină. Această nouă familie de neuropeptide are un rol fiziologic în controlul comportamentului din cursul situațiilor conflictuale, al anxietății, convulsiilor și probabil agresiunii.

Anxietatea poate fi atenuată sau stimulată la om prin diferite substanțe chimice care se leagă cu mare afinitate de locuri specifice de recunoaștere pentru benzodiazepine. Ocuparea acestor locuri cu diferiți derivați ai 1,4-benzodiazepinelor facilitează transmiterea GABA-ergică, ridică pragul convulsiilor declanșate de droguri care impietează asupra transmiterii GABA-ergice, prelungește deschiderea canalelor de ioni de clor antrenate de GABA și calmează episoadele de anxietate la om. În contrast, ocuparea acestor locuri de către esteri ai acidului beta-carbolin-3-carboxilic modulează negativ transmiterea GABA-ergică, scade pragul de convulsie al drogurilor care alterează transmiterea GABA-ergică, scade conductanța ionului de clor provocat de GABA și precipită starea de anxietate la om.

Cercetările citate sugerează că neuronii care conțin inhibitorul legării diazepamului (DBI) sînt prezenți în zonele Φ din creier care conțin neuroni

Scanned with OKEN Scanner

GABA-ergici. Se pare însă că nu toate celulele GABA-ergice conțin și DBI — așa se explică densitatea redusă a neuronilor care conțin DBI în centrii cerebrali bogați în neuroni GABA-ergici cum sînt *striatum* și *substantia nigra*. Pe de altă parte, celulele piramidale din *hippocampus* și din cortexul cerebral, care probabil nu conțin GABA, prezintă o puternică imunoreacție pentru DBI la șobolanii tratați cu colchicină. Aceste date dovedesc că neuropeptidele de tipul DBI sînt un grup complex care trebuie explorat în continuare pentru că ele deschid noi perspective terapiei bolilor psihice.

9.2.1.7. Incluziuni

În unele zone ale sistemului nervos central, pericarionii conțin granule de pigment *brun-închis* sau negru. Astfel de zone se întîlnesc la nucleul motor dorsal al vagului, în ganglionii spinali și în ganglionii simpatici, în *substantia nigra* a creierului intermediar și în *locus coeruleus* al planșeului ventriculului al IV-lea. Rolul funcțional al acestui pigment melanic în celula nervoasă nu este clar.

Un alt pigment prezent uneori în corpul celulelor nervoase este *lipofuscina*: este un pigment brun-deschis, care conține lipide ce se acumulează în cantitate din ce în ce mai mare odată cu vîrsta. Aceasta reprezintă probabil un material rezidual nedigerat de lizozomi. Picături *lipidice* pot fi întîlnite în celulele nervoase.

Printre incluziunile neuronilor se află și granulele de *glicogen*.

9.2.1.8. Veziculele acoperite

În neuroni sînt prezente frecvent vezicule acoperite. Ca și în alte tipuri de celule, veziculele acoperite sînt implicate în pinocitoza adsorbtivă, în transportul unor proteine de la reticulul endoplasmic la aparatul Golgi, de la aparatul Golgi la membrana plasmatică și de la un domeniu al suprafeței celulare la altul. Diversitatea căilor de transport traversate de veziculele acoperite de celule, sugerează că aceste organite trebuie să transporte (odată cu conținutul matricei lor) și molecule care să marcheze atît ținta (destinația) cît și tipul încărcăturii. Este firesc ca moleculele *marker* să fie proteine membranare integrale și ele au fost desemnate cu termenul de *„adaptor"* (engl. = = dispozitiv de cuplare), respectiv cu cel de *„cargo"* (engl. = încărcătură).

O mare parte (circa 35%) din veziculele acoperite din corpul neuronal conțin glicoproteine integrale, specifice pentru membranele *veziculelor sinaptice*. Veziculele acoperite transportă două tipuri de *glicoproteine* transmembranare destinate veziculelor sinaptice, una de 95 Kd și cealaltă de 65 Kd. Majoritatea veziculelor acoperite care transportă glicoproteine de 95 Kd nu le transportă și pe cele de 65 Kd și vice-versa. Veziculele acoperite conțin un număr redus de molecule glicoproteice pentru membranele veziculelor sinaptice — circa 15 exemplare *per* veziculă acoperită. Ele sînt prezente într-o mare varietate de sinapse și de celule endocrine.

Pe lîngă glicoproteinele transmembranare de 95 Kd și de 65 Kd, veziculele acoperite mai conțin *polipeptide transmembranare* de 38 Kd și de 29 Kd. Acestea sînt glicoproteine acide cu un pH 4,8, denumite sinaptolizine și reprezintă proteinele veziculelor sinaptice majoritare, deoarece ele sînt de circa 10 ori mai numeroase decît glicoproteinele de 95 Kd și, respectiv 65 Kd.

Scanned with OKEN Scanner

Întrucît polipeptidele de 29 Kd și de 38 Kd sînt prezente numai în veziculele acoperite din neuroni și nu și din cele din alte tipuri de celule (spre exemplu ele lipsesc din veziculele acoperite din ficat), este posibil ca ele să joace rolul de molecule „adaptor" (de dispozitive de cuplare) pentru proteinele transportate de veziculele sinaptice.

Un al treilea grup de polipeptide majore, cu greutatea moleculară de 80 și 86 Kd, a fost identificat la suprafața veziculelor presinaptice (asociate cu fața citoplasmatică a veziculelor); ele au fost denumite sinapsina I-a și, respectiv I-b. Sinapsinele și sinaptofizina sînt implicate în exocitoza veziculelor presinaptice.

Studii recente au dovedit că veziculele acoperite participă și la refacerea membranei sinaptice după exocitoza veziculelor sinaptice (vezi fig. 9.8). La nivelul joncțiunilor neuromusculare, de exemplu, deschiderea (exocitoza) veziculelor sinaptice la suprafața terminală a fibrei nervoase, survine în 3—4 milisecunde de la stimulare, veziculele acoperite trebuind să reinsere (prin endocitoză) un nou segment de membrană aproximativ o secundă mai tîrziu. Așadar, spre deosebire de endocitoza mediată prin receptor, întîlnită în majoritatea celulelor, *endocitoza* de la nivelul terminațiilor nervoase *este stimulată în mod specific de activitatea exocitotică a celulei nervoase*. Molecule specifice, cum sînt polipeptidele de 29 Kd și de 38 Kd, ar putea acționa și ca agenți de cuplare a ritmului endocitozei cu activitatea exocitotică.

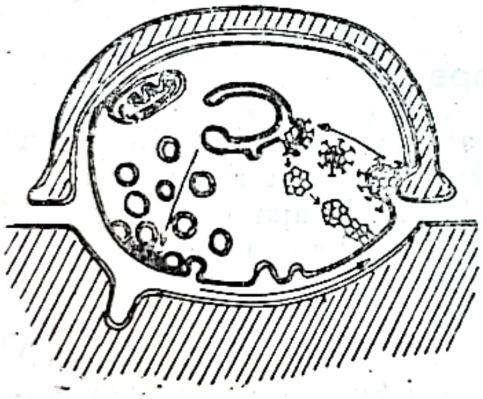


Fig. 9.8. — Schema reutilizării membranelor sinaptice: veziculele acoperite se formează pe latura membranei butonului presinaptic și sînt încorporate în reticulul endoplasmic; din acestea se formează noi vezicule sinaptice.

9.2.3. DENDRITELE (DENDRITUM)

Cele mai multe celule nervoase au numeroase dendrite, care sporesc considerabil suprafața (domeniul) receptoare a celulei. Ramificațiile dendritice oferă posibilitatea ca un singur neuron să primească și să integreze impulsurile de la un mare număr de terminații axonale aparținînd unor celule nervoase foarte diferite. Se apreciază că circa 200 000 de terminații axonale stabilesc contacte funcționale cu dendritele unei celule Purkinje din scoarța cerebeloasă. Neuronii cu o singură dendrită (neuroni bipolari) sînt rari și se găsesc numai în zone speciale. Spre deosebire de axoni, care au diametrul relativ constant de la un capăt la altul, dendritele devin din ce în ce mai subțiri pe măsură ce se subdivid prin ramificație.

Compoziția citoplasmei dendritelor este foarte asemănătoare cu cea a pericarionilor; totuși dendritele sînt lipsite de elemente Golgi. Corpii Nissl și

Scanned with OKEN Scanner

mitocondriile sînt prezente, cu excepția dendritelor foarte fine. Microtubulii (de 24 nm) și neurofilamentele (de 10m) sînt numeroși în dendrite. De obicei dendritele sînt scurte și se divid asemenea ramurilor unui arbore. În unele cazuri, totuși, ele prezintă alte forme caracteristice — ca de exemplu dendritele celulelor Purkinje din cerebel, care se ramifică într-un singur plan, luînd forma de evantai și mărind suprafața fiecărei celule de la 250 μm^2, în primele faze de dezvoltare, la 27 000 μm^2 la celula matură. De obicei, dendritele sînt acoperite de un mare număr de spini, care sînt mici proeminențe ce constituie locuri de contacte sinaptice (vezi fig. 9.15).

9.2.4. AXONUL

Fiecare neuron are un singur axon; el este o prelungire cilindrică, ale cărui lungime și diametru variază după tipul de neuron. Cu toate că există și unii neuroni cu axoni scurți, de obicei axonii sînt prelungiri celulare foarte lungi. De exemplu: axonii celulelor motorii din măduva spinării care inervează mușchii piciorului pot avea pînă la 100 cm lungime. Deoarece dendritele celulelor nervoase sînt mai numeroase, volumul lor total este de obicei mai mare decît cel al axonilor.

Axonii pornesc dintr-o regiune în formă de piramidă mică, denumită *con de emergență*, care de obicei se află localizat la nivelul pericarionului, însă în unele cazuri se află la rădăcina dendritei principale. Conul de emergență se poate deosebi de dendrite prin cîteva caractere histologice: *a*) reticulul endoplasmic rugos și ribozomii prezenți în pericarion și în dendrite nu trec și în conul de emergență axonal; *b*) în conul de emergență, microtubulii sînt grupați în mănunchiuri sau fascicule.

Membrana plasmatică axonală este denumită *axolemă* iar conținutul său — *axoplasmă* (fig. 9.9).

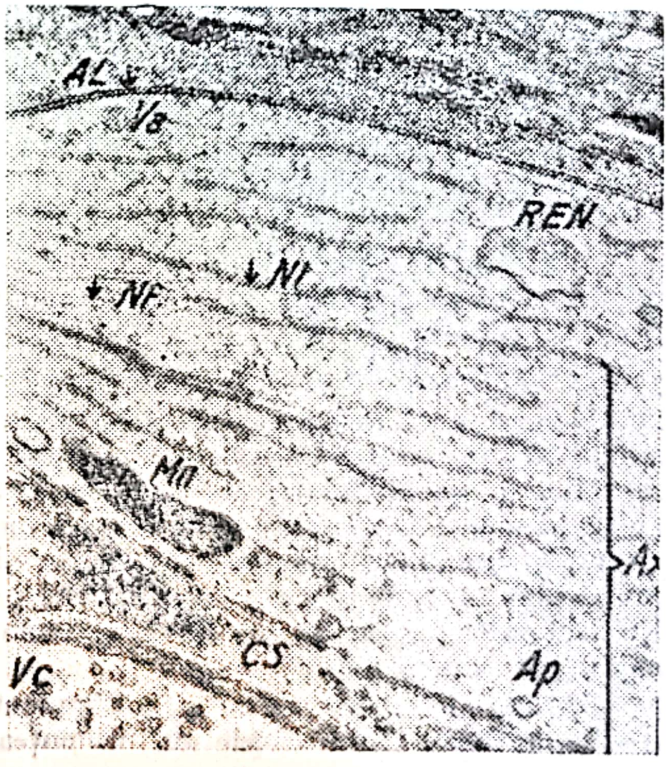


Fig. 9.9. — Imagine electromicroscopică a unui axon periferic amielinic × 5 500:
Ax — axon; *Al* — axolemă; *Nt* — neurotubuli; *Nf* — neurofilamente; *Ap* — axoplasmă; *CS* — celulă Schwann; *Vc* — vezicule colinergice; *Mn* — mitocondrie axonală; *REN* — reticul endoplasmic neted; *Va* — vezicule acoperite.

Scanned with OKEN Scanner

În neuronii ai căror axoni se mielinizează, segmentul de axon dintre conul de emergență și punctul la care începe mielina este denumit *segmentul inițial*. Această regiune a axonului este caracterizată de prezența, sub membrana plasmatică, a unui strat fin de material dens (la microscopul electronic), denumit *învelișul dens*. Microtubulii și microfilamentele sînt în continuare dispuse în fascicule și în segmentul inițial ca în conul de emergență.

Spre deosebire de dendrite, axonii au un diametru constant și nu se ramifică bogat. Uneori, axonul, la mică distanță după detașarea de corpul neuronal, poate da naștere unei ramuri care revine în zona din jurul corpului celular. În sistemul nervos central, axonii emit unele ramificații fine în unghi drept față de direcția principală, cunoscute sub denumirea de *colaterale*.

Citoplasma axonală (axoplasma) conține puține mitocondrii, neurotubuli și neurofilamente precum și un rar reticul endoplasmic neted, sub formă de vezicule și cisterne (fig. 9.9). Cantitatea redusă de organite citoplasmice explică nivelul scăzut al activității de sinteză prezentă în axon.

Neurotubulii (NT) sînt elementul ultrastructural predominant în axonul matur. Densitatea lor crește în cursul diferențierii neuriților. În neuriții tineri, cînd NT sînt încă rari, organitele membranare prezintă o orientare dezordonată față de axul neuritului. În plus, conturul axonului în secțiune transversală este foarte neregulat, schimbîndu-și probabil forma după mediul înconjurător. În axonii maturi creșterea frecvenței NT se corelează cu creșterea organizării neuritului. Profilul axonului este rotund, în ciuda influențelor externe, iar organitele membranoase sînt orientate longitudinal față de axul neuritului.

Există dovezi concludente că NT nu sînt continui pe toată lungimea axonilor. Astfel, neurotubulii se termină în mod frecvent în vecinătatea organitelor membranoase sau a membranei plasmatice și aceasta îndeosebi în cazul neuriților tineri. Reconstrucțiile după imaginile electronomicroscopice seriate dovedesc că NT din axoni ca și din dendrite sînt *structuri discontinue*. În adevăr, este greu de imaginat că axonii care au adesea lungimi de ordinul metrilor și care sînt supuși în cursul mișcărilor corpului la extensiuni de circa 10—15%, ar putea poseda un singur set continuu de neurotubuli de la somă pînă la terminațiile nervoase. Discontinuitățile și suprapunerile neurotubulilor axonali au un rol mecanic, acela de a permite extensia axonilor în anumite limite.

Cercetările sugerează că NT axonali au o anumită polaritate, în sensul că se ancorează cu un capăt pe organitele membranare și cu celălalt, pe membrana plasmatică.

Filamentele intermediare sau neurofilametele (NF) nu sînt o componentă dominantă în axoni. NF se întîlnesc rar în neuriții tineri și numai în axonii maturi contribuie în mod sensibil la volumul neuriților. Aceasta nu se aplică la axonii mari din sistemul nervos central și periferic în care NF au o contribuție importantă la calibrul neuriților. Distanța dintre NF axonilor ganglionului spinal este de 26 nm. Trebuie semnalat că metabolismul NF devine aberant în cursul transformării maligne a unor neuroni, deoarece NF sînt înlocuite cu un alt tip de filamente intermediare, și anume cu filamente de vimentină.

Filamentele de actină (sau microfilamentele din axon) nu sînt o componentă structurantă, în sensul că ele nu influențează forma neuritului; ele participă

Scanned with OKEN Scanner

însă la ocuparea spațiului dintre organite și citoschelet, controlînd astfel volumul spațiului dintre organite.

Reticulul endoplasmic neted (REN) formează o rețea de membrane în formă de cisterne sau de tubuli, orientate longitudinal și distribuite relativ uniform în axon. Se presupune că această rețea membranară prezintă elemente de contiguitate în lungul axonului care stabilesc contacte cu membranele mitocondriale și cele ale corpilor multilamelari.

Numărul și repartiția *mitocondriilor* dintr-un anumit axon sînt un indicator al nivelului activității metabolice aerobe din neuritul respectiv. Frecvența mitocondriilor este mai mare în axonii tineri.

Corpii multiveziculari, corpii multilamelari și granulele dense mari sînt grupate în așa-numiții *corpi denși*. Funcția acestor organite nu este foarte clară. Granulele dense mari ar putea fi un organit catabolic intermediar în care ar fi reciclate elementele membranoase. Corpii multilamelari s-a presupus mai întîi a fi organitele de stocare a reticulului endoplasmic neted, iar mai recent se consideră că transportă retrograd rămășițele mitocondriale. Corpii multiveziculari conțin și transportă veziculele înglobate prin endocitoză. Aceste organite ar tebui să fie mai frecvente în neuriții tineri, în care forma și distribuția citomembranelor se schimbă rapid. Cu toate acestea, corpii denși sînt mai puțin abundenți în axonii tineri decît în cei maturi. Corpii denși reprezentînd o mare parte din organitele cunoscute a fi transportate pe cale retrogradă, creșterea frecvenței lor odată cu maturarea neuriților sugerează că transportul retrograd se amplifică în cursul diferențierii axonilor.

9.2.5. SINAPSELE (SYNAPSIS INTERNEURONALIS)

Dacă axonul este stimulat experimental, impulsul nervos este condus în ambele direcții de la punctul de stimulare. Impulsul îndreptat către corpul celular nu excită totuși alți neuroni (cu care se află în legătură corpul celulei respective); numai impulsurile care ajung la arborizațiile terminale axonale pot excita neuronul vecin din lanțul neuronal și această proprietate este denumită polaritate dinamică.

Polarizarea dinamică și transmiterea impulsului nervos de la o celulă la alta se realizează de către structuri specializate denumite *sinapse*. De obicei sinapsele sînt între un axon și dendrite (axodendritice) sau între axon și corpul celulei vecine (axosomatic). Există însă și sinapse între axoni (axoaxonice) sau între dendrite (dendrodendritice). Tendința actuală este ca și terminațiile nervoase pe celulele efectorii (ca celulele glandulare sau fibrele musculare) să fie considerate tot sinapse (fig. 9.10). Funcția sinapselor are ca efect modificarea potențialului de membrană al neuronilor-țintă. Acțiunea unei anumite sinapse asupra unui neuron este în legătură cu distanța sa de axonul respectiv. În consecință, influența unei informații primită la nivelul unui neuron este în legătură intimă cu distribuția și localizarea, ca și cu numărul sinapselor de pe arborele dendritic și de pe corpul celulei respective.

Se pot identifica morfologic mai multe tipuri de sinapse (fig. 9.10). Terminația axonală poate fi în formă de bulb, de clopot, de coș sau de măciucă. Terminațiile sinaptice în bulb sînt adeseori denumite *butoni terminali*. Uneori ramurile axonale stabilesc mai multe sinapse pe traiectul lor. În acest caz, aspectul axonului se prezintă varicos, datorită prezenței *butonilor de pe traiect*.

Scanned with OKEN Scanner

Examenul la microscopul electronic al sinapselor dovedește că aceste formațiuni specializate formează în adevăr contacte între cele două celule. A devenit clar că sinapsa este un complex structural alcătuit din trei componente: *terminația presinaptică*, *spațiul intersinaptic* și *dispozitivul postsinaptic*. După mecanismul care stă la baza transmisiei impulsului la nivelul joncțiunii (fig. 9.11) distingem două grupe de sinapse: *a*) *sinapsele chimice* a căror activitate se bazează pe un anumit mediator chimic și *b*) *sinapsele electrice* a căror activitate se bazează pe transmiterea ionilor direct prin intermediul joncțiunilor de tip *gap*, realizîndu-se astfel cuplarea electrică. O perioadă de timp s-a crezut că primul tip de sinapse (sinapsele chimice) sînt caracteristice vertebratelor superioare iar cel de al doilea tip (sinapsele electrice), îndeosebi animalelor inferioare. În ultima vreme s-a putut constata că și în creierul uman există relativ frecvente sinapse electrice, deși mai puțin numeroase decît sinapsele chimice.

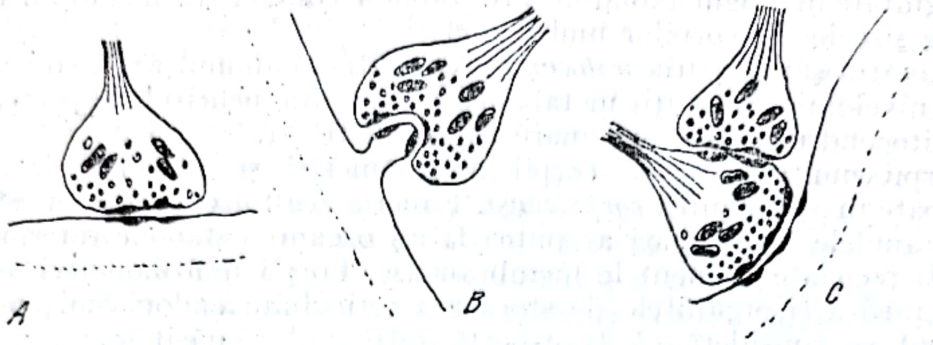


Fig. 9.10. — Schema diferitelor tipuri de sinapse:
A — axodendritică; *B* — axodendritică la nivelul unui spin dendritic și *C* — axoaxonică.

Sinapsele chimice se caracterizează prin prezența în butonul presinaptic a *veziculelor sinaptice*, cu un diametru de 20—65 nm, uneori chiar 160 nm, și prin prezența unui *spațiu intersinaptic* de circa 20 nm (fig. 9.11).

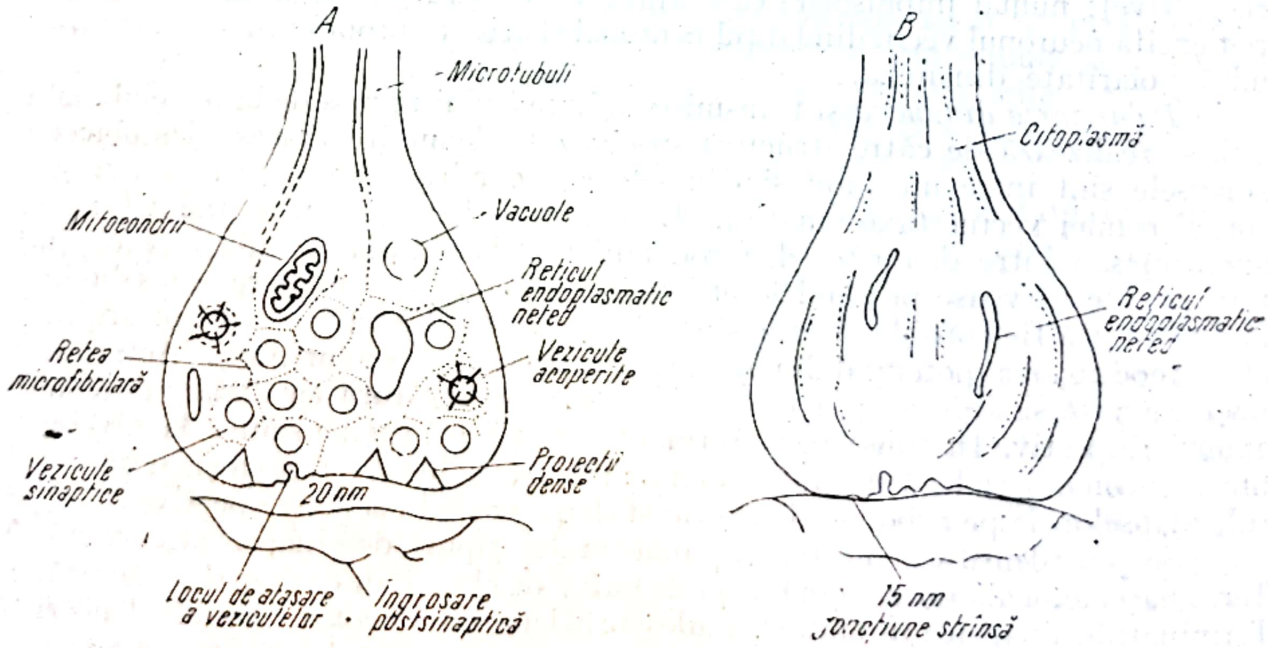


Fig. 9.11. — Schema sinapsei chimice și a sinapsei electrice:
A — sinapsa chimică; *B* — sinapsa electrică.

Scanned with OKEN Scanner

Butonul presinaptic, pe lîngă veziculele sinaptice, mai conține și cîteva *mitocondrii*, *vezicule acoperite*, *reticul endoplasmic neted*, sub formă de cisterne sau vezicule mari, *precum și un citoschelet* reprezentat atît prin microtubuli cît și prin microfilamente distribuite difuz. În lungul spațiului intersinaptic se află „zona activă" a butonului presinaptic, la nivelul căreia veziculele stabilesc contacte cu membrana presinaptică și *eliberează mediatorii chimici* în spațiul intersinaptic.

Membrana presinaptică se individualizează prin trei caractere: *a)* curburile sale variază în funcție de condițiile experimentale; *b)* prezența unor profiluri în formă de omega (la locurile de atașare a veziculelor) și uneori apariția unor pliuri; *c)* pe frontul citoplasmic sînt asociate densificări proteiniforme, dispuse ca un grilaj, în rețea hexagonală presinaptică.

S-au făcut unele progrese în ceea ce privește corelația dintre aspectul veziculelor din butonul presinaptic și funcția sinapsei respective. Astfel, se consideră că în sistemul nervos central, sinapsele care conțin vezicule presinaptice rotunde sînt *sinapsele excitatorii* iar cele care conțin vezicule turtite sînt *inhibitorii*. De asemenea sinapsele cu vezicule clare, cu diametrul constant de cca 40 nm, sînt *sinapse colinergice;* cele cu vezicule cu diametrul de cca 50 nm și cu un conținut dens la fluxul de electroni sînt *sinapse adrenergice;* iar cele cu vezicule mari, cu diametrul de cca 100 nm și cu conținut dens sînt considerate sinapse ce conțin *neuropeptide* (fig. 9.12 și 9.13).

Se consideră că membranele veziculelor presinaptice sînt *reciclate* printr-un proces de exocitoză cuplat cu endocitoza. Astfel, așa cum este ilustrat în fig. 9.8, după ce mediatorii chimici sînt exocitați în spațiul intersinaptic, membranele veziculelor exocitate sînt modulate și se deplasează

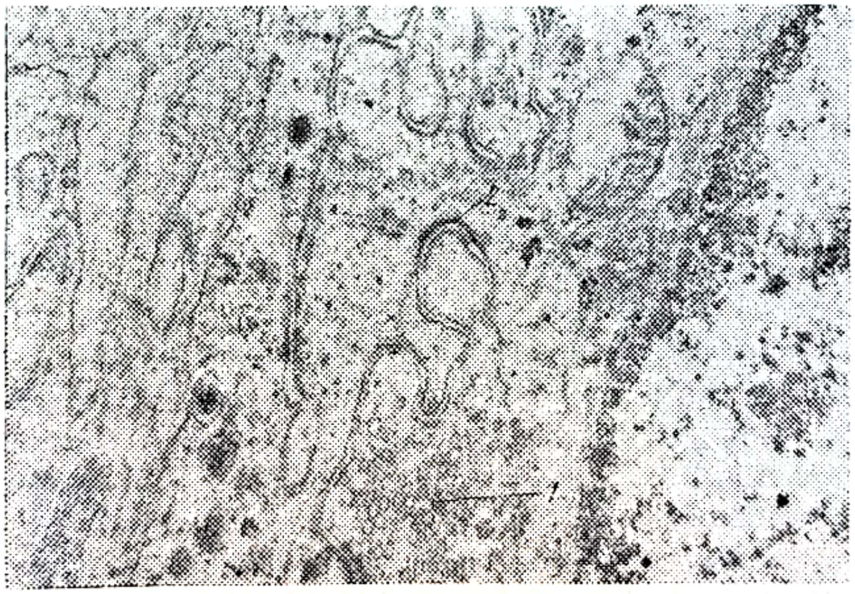


Fig. 9. 12. — Imagine electronomicroscopică × 22 000. Buton sinaptic *colinergic* în citoplasma unei celule secretorii din medulosuprarenală. Butonul presinaptic nervos în centrul figurii: *1* — se remarcă aglomerarea de vezicule goale, cu diametru omogen (circa 40 nm); *2* — densificări ale membranei presinaptice și postsinaptice (ale marginii celulei epiteliale) în trei puncte diferite. Pe una din marginile figurii se remarcă un fragment din nucleul celulei epiteliale și pe latura opusă, granulele secretorii de la suprafața celulei epiteliale.

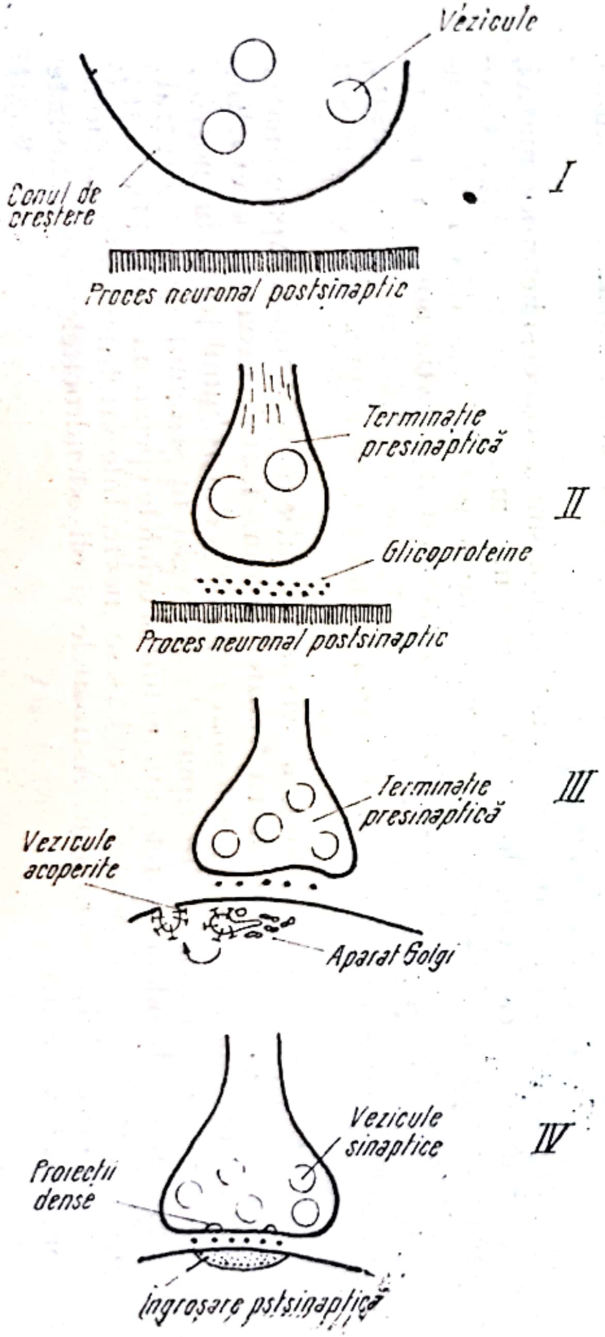
Scanned with OKEN Scanner

Fig. 9. 13. — Imagine electronomicroscopică × 5 000. Butoni presinaptici *adrenergici* la suprafața unei fibre musculare netede din peretele unei artere. Butonul, de talie mică, conține mitocondrii, vezicule cu conținut dens (circa 50 nm), vezicule cu conținut clar (mai mici) și punct de densificare a membranei presinaptice.

pe laturile butonului presinaptic, unde are loc procesul de endocitoză, adică de formare a veziculelor acoperite.

Sinaptogeneza. Sinapsele sînt rezultatul unei serii de evenimente prin care conul de creștere axonal stabilește legături specifice, stabile, cu prelungirile altor neuroni (fig. 9.14). Odată stabilită o legătură viabilă a conului de creștere, axonul terminal se transformă în buton presinaptic și regiunea de contact a neuronului vecin devine regiunea postsinaptică. Se descriu patru faze de desfășurare a sinaptogenezei: I. stabilirea de contacte între filopodele conului de creștere axonal și prelungirile neuronului postsinaptic; II. recunoașterea interneuronală care se bazează pe specificitatea chimică a unor glicoproteine ale matricei extracelulare; III. începerea îngroșării postsinaptice, inițiată de elementele golgiene și de veziculele acoperite care apar în această zonă; IV. constituirea sinapsei definitive (vezi fig. 9.14). Sistemul nervos al mamiferelor păstrează capacitatea de a-și modifica numărul, natura și nivelul de activitate a sinapselor sale în cursul întregului ciclu vital. Plasticitatea neuronală, impusă de nevoile de adaptare continuă la condițiile de mediu (inclusiv de activitățile nervoase specifice ca memorizarea și învățarea), constă în primul rînd în capacitatea sinapselor de a-și modifica funcțiile, de a fi înlocuite și de a crește sau a descrește numeric după nevoi (fig. 9.15). Plasticitatea sinaptică trebuie înțeleasă în sensul că în sistemul nervos există un *turnover al sinapselor* al căror ritm variază cu *vîrsta* individuală (fiind mai activ la tineri decît la bătrîni), cu *regiunea sistemului nervos*, precum și cu *intensitatea stimulilor*. Stimulii naturali sau agresiunile de diferite tipuri pot produce pierderi, formarea sau înlocuirea sinapselor (vezi fig. 9.15) din toate regiunile sistemului nervos și la toate vîrstele.

Scanned with OKEN Scanner



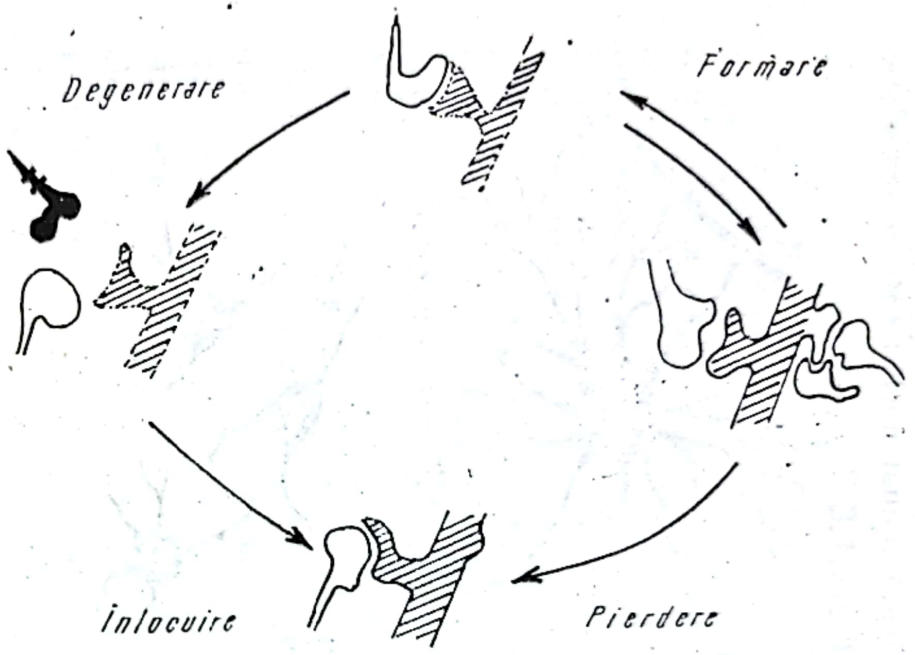


Fig. 9. 15. — Ciclul sinaptic.

Fig. 9. 14. — Etapele formării sinapselor (explicații în text).

9.3. NEVROGLIILE (NEUROGLIA)

Mai multe tipuri de celule din sistemul nervos, asociate cu neuronii, sînt clasificate ca *nevroglii* sau *celule gliale*. Nevrogliile au caractere morfologice diferite (fig. 9.16). Preparatele de rutină colorate cu hematoxilină-eozină nu sînt potrivite pentru studiul nevrogliilor, deoarece prin această tehnică de colorare pot fi puși în evidență numai nucleii care se deosebesc

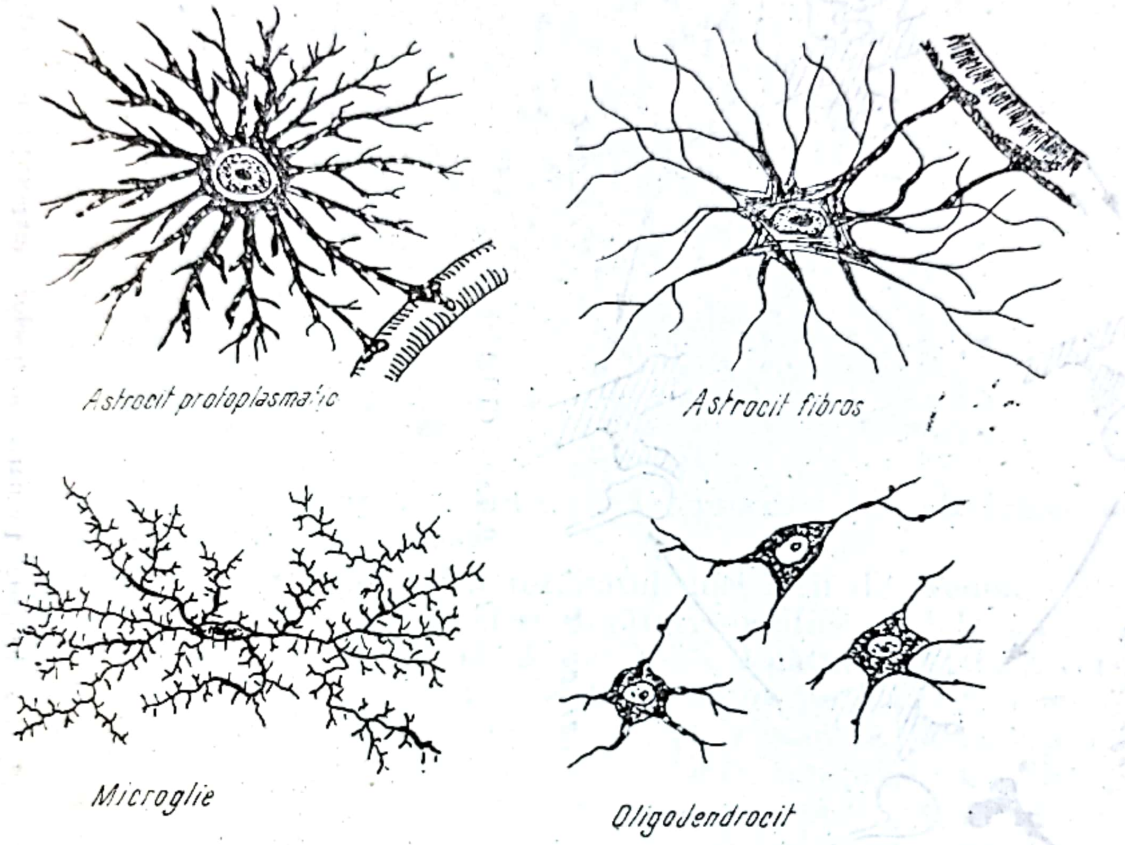


Fig. 9. 16. — Schema celulelor nevroglice din sistemul nervos central așa cum se văd la microscopul optic, după impregnații cu metale grele.

de nucleii celulelor nervoase (cei ai nevrogliilor sînt mai mici și heterocromatici, în vreme ce nucleii celulelor nervoase sînt mai mari și eucromatici). Citoplasma și prelungirile celulelor nevroglice nu se pot distinge de cele ale celulelor nervoase. Nevroglia joacă un rol important în funcția normală a sistemului nervos. Pentru studiul caracterelor sale morfologice sînt necesare metode speciale care incumbă folosirea tehnicilor de impregnare cu aur sau cu argint.

Se apreciază că în sistemul nervos central există în medie aproximativ cîte 10 celule nevroglice pentru fiecare neuron. Totuși, deoarece nevrogliile sînt cu mult mai mici, ele ocupă doar circa 50% din volumul țesutului nervos.

Se descriu mai multe tipuri de nevroglii în sistemul nervos central: astrocitele, oligodendrocitele, microgliile și celulele ependimare (vezi fig. 9.16). În sistemul nervos periferic se găsesc nevrogliile-satelite din ganglionii periferici și celulele Schwann. Astrocitele și oligodendrocitele sînt denumite împreună *macroglii*.

Scanned with OKEN Scanner

Se consideră că celulele nevroglice nu generează potențial de acțiune nervos și că nu concură la formarea sinapselor interneuronale. Ele formează tecile de mielină în jurul axonilor și sînt probabil necesare pentru susținerea și pentru viabilitatea neuronilor. Această ultimă proprietate este sugerată și de faptul că pentru menținerea neuronilor în culturi *in vitro* este necesară și prezența nevrogliilor în cultura respectivă.

9.3.1. ASTROCITELE

Astrocitele sînt cele mai mari nevroglii, cu prelungiri numeroase și lungi. Ele au nucleu sferic, localizat central, colorat slab. Unele din prelungirile lor au pediculi extinși care se atașează de peretele capilarelor sanguine. Aceste prelungiri, denumite „pediculi vasculari" nevroglici, înconjură complet într-o teacă toate vasele care pătrund în țesutul nervos pentru a-l hrăni. Prelungirile astrocitare sînt de asemenea prezente la periferia sistemului nervos central, formînd un strat sub *pia mater*. Acest strat, care mai cuprinde prelungiri și de la alte tipuri de nevroglii, separă țesutul conjunctiv al *pieî mater* de celulele nervoase. În mod curent se deosebesc două tipuri de astrocite: *a) protoplasmatice*, care se găsesc în substanța cenușie a sistemului nervos central, și *b) fibroase*, care se găsesc în principal în substanța albă.

În imaginile electronomicroscopice, astrocitele se remarcă prin citoplasma relativ clară, mai săracă în organite și bogată în filamente intermediare, cunoscute sub denumirea de *gliofilamente*. Gliofilamentele sînt specifice pentru nevroglii, ele vor fi deci prezente în toate tipurile de celule nevroglice. Astrocitele reprezintă 20% din celulele nevroglice ale sistemului nervos central.

9.3.1.1. Astrocitele protoplasmatice

Astrocitele protoplasmatice au o citoplasmă granulară abundentă. Prelungirile lor au numeroase ramuri, mai scurte decît cele ale astrocitelor fibroase și relativ groase. Prelungirile lor învăluie suprafața celulelor nervoase din sistemul nervos central, sinapsele și vasele sanguine (fig. 9.17).

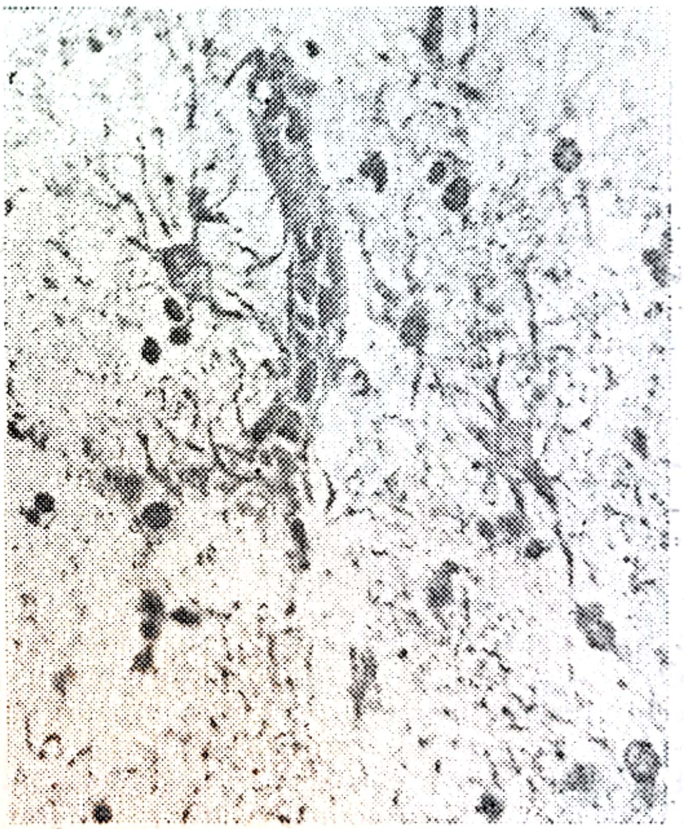


Fig. 9. 17. — Astrocit protoplasmatic.

Scanned with OKEN Scanner

9.3.1.2. Astrocitele fibroase

Astrocitele fibroase au prelungiri lungi, subțiri și netede care se ramifică rar. Îndeosebi în preparatele colorate cu argint, citoplasma lor prezintă un material fibrilar alcătuit probabil din precipitarea filamentelor intermediare care sînt abundente atît în corpul celular cît și în prelungirile astrocitelor fibroase (fig. 9.18). Cele două categorii de astrocite, protoplasmatice

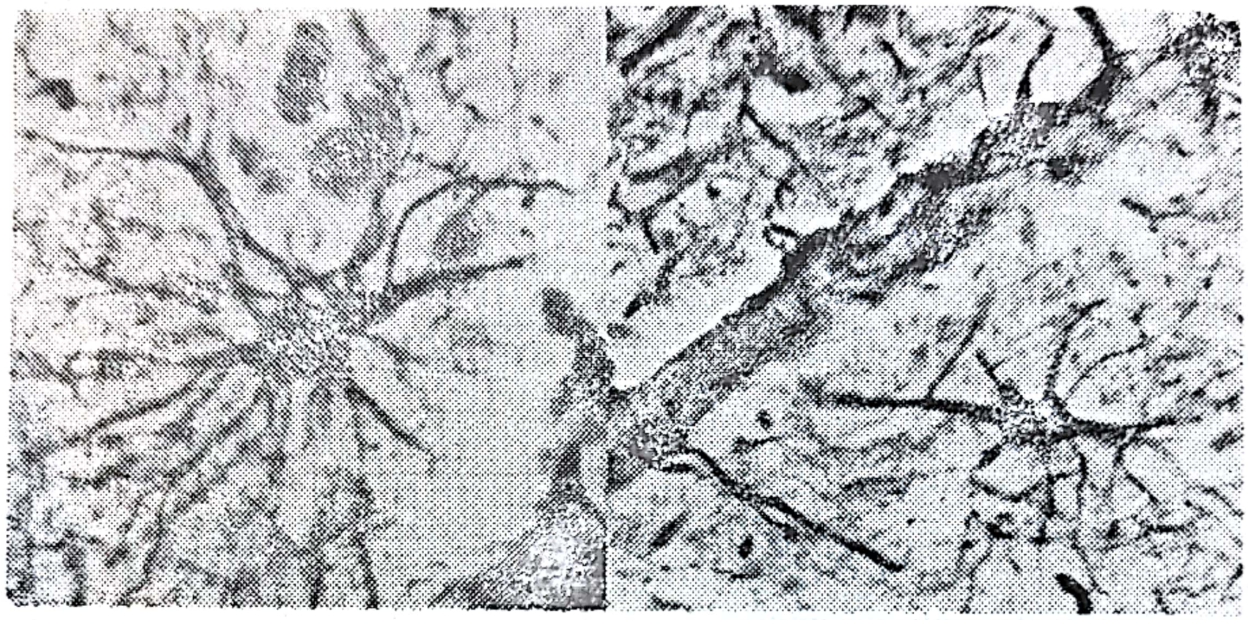


Fig. 9. 18. — Astrocit fibros.

și fibroase, diferă nu numai prin caracterele lor morfologice sau prin localizarea în SNC, ci și prin fenotipul lor antigenic și histogeneza distinctă (*J. Neurosci.*, 1984, 4, 584—592). Dar nu numai atît, recent (*J. biol. Cell.*, 1986, *102*, 2 244—2 253) s-a dovedit că cele două categorii de astrocite pot fi mai departe subdivizate după capacitatea lor de a exprima antigeni H-2 ca răspuns la tratamentul cu interferon. Pe această bază pot fi identificate astrocite H-2-pozitive și astrocite H-2-negative (vezi detalii în paragraful „SNC și imunogeneza" de la sfîrșitul acestui capitol). Aceste date demonstrează în mod clar că SNC conține cu mult mai multe *sub*tipuri de astrocite decît s-a crezut pînă în prezent.

9.3.2. OLIGODENDROCITELE

Oligodendrocitele reprezintă majoritatea celulelor gliale din sistemul nervos central — circa 75% din totalul gliocitelor. Ele sînt mult mai mici decît astrocitele și prelungirile lor sînt puțin numeroase și mai scurte decît cele prezente în alte tipuri de nevroglii. Oligodendrocitele se găsesc atît în substanța cenușie cît și în cea albă. În substanța cenușie ele sînt de obicei localizate în apropierea pericarionilor. Numărul oligodendrocitelor crește odată cu creșterea complexității sistemului nervos în seria animală. Țesutul nervos uman are cel mai mare număr de oligodendrocite pe neuron.

Scanned with OKEN Scanner

În substanța albă, oligodendrocitele apar în cercuri printre fibrele mielinizate. La microscopul electronic, în țesutul nervos fetal, se constată că tecile de mielină din sistemul nervos central sînt produse de prelungirile oligodendrocitelor. Din acest punct de vedere oligodendrocitele sînt asemănătoare celulelor Schwann din nervii periferici.

Citoplasma oligodendrocitelor este densă la fluxul de electroni și constă în principal din mitocondrii, ribozomi, microtubuli și gliofilamente. Aceste caractere permit identificarea lor pe imaginile la microscopul electronic. Nucleii sînt rotunjiți, mici și conțin cromatină relativ condensată.

În culturile de celule, oligodendrocitele prezintă mișcări intense care par să aibă o periodicitate specifică.

9.3.3. MICROGLIILE

Microgliile sînt principalele celule fagocitare din creier; ele se prezintă sub două forme: *a) celula amoeboidală*, similară morfologic cu macrofagul, este prezentă în cursul dezvoltării creierului și apare în leziunile cerebrale la adult; *b) celula ramificată*, considerată „în repaus", prezentă în sistemul nervos central normal la adult. Cercetări recente de histochimie și de microscopie electronică (*J. biol. Cell.*, 1986, *102*, 812—820) sugerează că microglia amoeboidă este o celulă fagocitară activă care, eventual, se diferențiază în celula ramificată de repaus.

Microgliile, în histologia clasică, sînt evaluate ca reprezentînd 5% din nevrogliile sistemului nervos central. Corpul celulelor microgliale este mic, dens și alungit (fig. 9.19). Nucleii lor prezintă cromatină foarte condensată și o formă alungită în sensul axului mare al corpului celular. Forma nucleilor microgliilor permite identificarea lor în preparatele colorate cu hematoxilină-eozină, deoarece celelalte nevroglii au nuclei sferici. Microglia are prelungiri scurte, acoperite de expansiuni mici, ce le dă un aspect spinos. Microgliile nu sînt numeroase, dar prezente atît în substanța albă cît și în substanța cenușie a sistemului nervos central (fig. 9.19).

Fig. 9. 19. — Microglie.

Cercetările recente au demonstrat că atît *in vitro* cît și *in vivo* microgliile secretă un polipeptid denumit *factor de proliferare glială*. Acesta stimulează proliferarea astrocitelor și oligodendrocitelor *in vitro*, în cursul gliogenezei *in vivo*, precum și pe parcursul formării cicatricelor gliale, ca urmare a unor leziuni nervoase.

Cu toate că în preparatele la microscopul optic, prin reacție de colorare specială cu argint apar mai multe microglii, la microscopul electronic se observă foarte puține. Este posibil ca unele din așa-zisele celule microgliale observabile la microscopul optic, să fie în realitate oligodendrocite,

Scanned with OKEN Scanner

rar *glioblaste* imature. Totuși, există cîteva *celule microgliale macrofagice* care par să provină din monocitele sanguine și care reprezintă sistemul fagocitar mononuclear din țesutul nervos.

9.3.4. CELULELE EPENDIMARE

Celulele ependimare derivă din stratul intern al tubului neural și păstrează așezarea epitelială a acestora, în timp ce celelalte celule ale tubului neural dau naștere neuronilor sau nevrogliilor. Celulele ependimare mărginesc cavitățile creierului și ale măduvei spinării, fiind scăldate de lichidul cerebro-spinal care umple aceste cavități. În viața embrionară, celulele ependimare au cili care uneori sînt prezenți și la adult în unele părți ale ventriculilor. Celulele ependimare se continuă cu celulele cuboidale ale plexurilor coroide.

În timp ce porțiunea apicală a celulelor ependimare delimitează cavitățile, baza lor nu este uniformă și constă din prelungiri lungi care se extind de la centrul creierului la țesutul conjunctiv periferic care învelește sistemul nervos central. În consecință, prelungirile celulelor ependimare se extind printre elementele neuronale și construiesc o matrice de susținere, similar cu celelalte celule gliale. Datorită formei columnare a celulelor ependimare care delimitează lumenul cavităților cerebrale și canalul central al măduvei spinării, organizarea sistemului nervos central poate fi asemuită cu un deosebit de gros epiteliu stratificat columnar (cilindric).

9.3.5. NEVROGLIILE SISTEMULUI NERVOS PERIFERIC

În sistemul nervos periferic, nevrogliile sînt reprezentate de: *a) celulele Schwann* din nervi, care formează teci în jurul axonilor și *b) celulele-satelite* din ganglioni (celule asemănătoare oligodendrocitelor centrale) care înconjură fiecare neuron din ganglionii periferici.

9.3.6. HISTOFIZIOLOGIA NEVROGLIILOR

Părerile actuale privitoare la rolul celulelor nevroglice în fiziologia țesutului nervos provin îndeosebi din studiile asupra morfologiei lor. Localizarea nevrogliilor printre neuroni, pentru a-i separa pe unii de ceilalți, pentru a-i separa de vasele sanguine sau de lichidul cerebro-spinal, sugerează că celulele gliale sînt suportul structural al neuronilor, că ele efectuează izolarea electrică, că procură substanțele hrănitoare și că preiau metaboliții. Histologii constată că celulele gliale suferă modificări sau alterări în diferite stări funcționale, că de exemplu, ele proliferează în cursul degenerării și fagocitează elementele neuronale degenerate. Cea mai bine stabilită funcție a acestor celule este producerea tecilor de mielină de către celulele Schwann din sistemul nervos periferic și de către oligodendrocite în sistemul nervos central. Teaca de mielină determină mărirea vitezei de conducere a influxului nervos în fibrele nervoase (permițînd ca un axon cu diametrul mai mic să transporte

Scanned with OKEN Scanner

o cantitate de informație mai mare, cu o viteză mai mare) și diminuarea cheltuielilor metabolice necesare pentru menținerea concentrației ionice, ca urmare a propagării influxului nervos în axonii vertebratelor.

În stadiul actual de dezvoltare a cunoștințelor noastre despre nevroglii trebuie să luăm în considerație și proprietățile generale ale acestor celule și să nu ne rezumăm exclusiv la evaluarea deosebirilor morfologice care își au originea, în mare măsură, în tehnicile utilizate pentru studierea lor.

9.3.6.1. Proprietățile fiziologice ale nevrogliilor

Potențialul de membrană depinde de potasiul extern. Cercetările de electrofiziologie efectuate pe celulele gliale și pe neuroni în culturi de țesuturi *in vitro* au condus la concluzia că *potențialul de repaus al nevrogliilor este mai mare decît cel al neuronilor și că membrana nevrogliilor este predominant, dacă nu exclusiv, permeabilă pentru potasiu.* Aceste observații au fost confirmate ulterior *in vivo* pe nevrogliile sistemului nervos central provenite de la mai multe specii de animale, inclusiv de mamifere. Valoarea potențialului membranei gliale variază în condiții normale de la —70 la —90 mV. Explicația cea mai simplă a potențialului de membrană glială este distribuția inegală a potasiului de o parte și de alta a acestor membrane. Concentrația potasiului în nevrogliile de pisică este de circa 200 mEq/litru. În lumina acestor date, presupunerea formulată în trecut, și anume că celulele gliale ar constitui „spațiul extraneuronal" al sistemului nervos, se dovedește a fi falsă, deoarece celulele nervoase nu pot conduce impulsul decît într-un mediu cu o concentrație de K^+ constantă, de circa 25 mEq/litru. Canalele de potasiu ale nevrogliilor sînt selective, au un diametru de 0,3 nm și un punct electrostatic scăzut.

Proprietățile electrice ale membranelor. Cînd oligodendrogliile sau celulele Schwann înfășoară un axon cu straturi concentrice de membrane, teaca de mielină care se formează conferă o înaltă rezistență și o scăzută capacitanță membranei axonale cu care este asociată. De aceea pătrunderea fluxului de ioni în interiorul axonului la un nod Ranvier antrenează ieșirea ionilor la nodul adiacent și aceasta are drept consecință conducerea saltatorie a curentului în lungul axonului mielinic. Explorarea proprietăților electrice ale altor celule gliale are drept scop să determine dacă celulele gliale sînt implicate în semnalele electrice ale sistemului nervos, și, de asemenea, să măsoare conductanța acestor celule la ioni. Trebuie mai întîi semnalat că studiul proprietăților membranelor celulelor gliale este deosebit de dificil datorită atît formei deosebit de complexe a nevrogliilor cît și pentru că aceste celule sînt cuplate electric prin intermediul unor numeroase joncțiuni *communicans*. Cercetările efectuate pînă în prezent arată că celulele gliale răspund pasiv la deplasarea potențialului de membrană în condiții fiziologice. Astfel, pentru variațiile potențialului de membrană sub — 100 mV, conductanța ionilor prin membranele gliale nu depinde de voltaj iar locurile responsabile pentru o astfel de conductanță nu pot fi detectate.

Conexiunile electrice intergliale. Nevrogliile (asemenea altor celule din corpul omenesc, cu excepția celor mai multe celule nervoase și a fibrelor musculare scheletale) sînt conectate una cu alta prin intermediul unor joncțiuni de joasă rezistență electrică, de tipul joncțiunilor *gap* sau *communicans*.

Trebuie precizat că nu există dovezi *in vivo* privitor la existența unor joncțiuni electrice între neuroni și nevroglii; cu toate că în timpul dezvoltării

Scanned with OKEN Scanner

embrionare celule de tipuri diferite se cuplează electric, astfel de joncțiuni dispar în cursul terminării procesului de diferențiere celulară, joncțiunile persistînd numai între celulele de același tip cum sînt celulele nevroglice.

Funcția joncțiunilor speciale de tip *gap* dintre celulele nevroglice nu este clară. Probabil că acestea intervin în proprietatea nevrogliilor de a egaliza concentrația potasiului în spațiul extraneuronal.

9.3.6.2. Interacțiunile dintre nevroglii și neuroni

Problema centrală în studiul nevrogliei este clarificarea mecanismelor prin care aceste celule interacționează cu neuronii, în cursul activității sistemului nervos. În cazul celulelor producătoare de mielină (ca oligodendrogliile și celulele Schwann) relațiile simbiotice dintre neuron și glie sînt evidente. De exemplu, dacă în fibrele nervoase din nervul optic al omului, ar lipsi teaca de mielină, diametrul nervului ar trebui să crească de la 2 mm la circa 100 mm, pentru a transporta aceeași cantitate de informații și cu aceeași viteză. În unele procese patologice, rolul nevrogliilor în fagocitarea rămășițelor neuronale a fost de asemenea stabilit.

În ciuda creșterii interesului pentru nevroglii, în ultimii ani, nu s-au putut stabili funcții clare pentru masa celulelor astrocitare. Cu toate acestea s-au făcut unele supoziții și s-au obținut unele date care fundamentează unele ipoteze formulate la începutul secolului, privitor la interacțiunile neurogliale.

• *Detectarea activității neuronale.* S-a arătat că în cursul activității nervoase, celulele gliale din scoarța cerebrală suferă o lentă depolarizare. Ținînd seama de marea sensibilitate a potențialului membranei gliale față de potasiu, de spațiul intercelular foarte îngust dintre neuroni și nevroglii, precum și de schimbările în amplitudinea depolarizării lente care însoțesc impulsurile nervoase odată cu modificarea potasiului extracelular, se poate conchide că lenta depolarizare glială este consecința acumulării potasiului în spațiul dintre neuroni și nevroglii. Această concluzie a fost confirmată și prin măsurarea directă a potasiului intercelular, care crește odată cu creșterea activității nervoase.

Așadar, activitatea nervoasă este recepționată de nevroglii prin depolarizarea membranei gliale; o legătură dintre activitatea nervoasă și depolarizarea glială o constituie potasiul eliberat în cursul activității neuronale.

Depolarizarea mediată de potasiu poate servi ca un semnal generalizat pentru a corela funcția nevrogliei cu cea neuronală. Ea este lipsită de specificitate (spre deosebire de sinapsa nervoasă), deoarece celulele gliale formează un „sincițiu" electric și depolarizarea care survine la nivelul unei celule gliale se transmite pasiv la nevrogliile vecine. Depolarizarea glială semnalează activitatea neuronilor din vecinătate dar nu pare să procure informații subtile. Astfel, nevrogliile nu pot face deosebirea între activitatea nervoasă excitatorie și cea inhibitorie, deoarece potențialul de acțiune este același în ambele tipuri de axoni.

Este posibil ca și alte substanțe să acționeze ca mesageri chimici între neuroni și nevroglii. De exemplu norepinefrina crește activitatea lactat-dehidrogenazei în celulele gliale.

• *Contribuie la potențialul extracelular.* Există dovezi indubitabile că schimbările în potențialul de membrană al celulelor gliale contribuie (alături de potențialul inhibitor sau excitator, de potențialele sinaptice și de hiper-

Scanned with OKEN Scanner

polarizarea sau depolarizarea neuronală) la potențialul extracelular în diferite regiuni ale sistemului nervos ca nervul optic, scoarța cerebrală și altele.

• *Efectele metabolice ale creșterii potasiului.* Observația că celulele gliale se depolarizează ca urmare a eliberării potasiului în cursul activității axonale, ridică problema măsurii în care metabolismul nevrogliilor este afectat în atare condiții. S-a presupus de mult că metabolismul cerebral este alterat de schimbările survenite în concentrația potasiului extracelular și ulterior s-au obținut dovezi că celulele gliale își alterează activitatea respiratorie ca urmare a creșterii concentrației potasiului extern. Recent, s-a putut arăta că creșteri în concentrația potasiului de numai 6—12 mEq/litru sînt suficiente pentru a reduce nivelul NADH intracelular.

• *Schimburi între neuron și nevroglii.* Ipoteza relațiilor simbiotice între neuroni și glie implică un schimb de substanțe între cele două tipuri de celule. Există dovezi furnizate de examinările la microscopul optic privind transferul de glicogen și de lipide (sau de precursorii lor) de la glie la celulele ganglionare, prin intermediul prelungirii celulare. Injectarea intraperitoneală a unor aminoacizi marcați radioactiv (ca leucina și histidina) a dus la identificarea lor mai întîi în celulele nevroglice și apoi în celulele nervoase. Studii recente sugerează existența unor schimburi dinamice de substanțe între neuroni și nevroglii. Astfel de schimburi pot constitui o bază pentru dependența integrității tecii gliale de integritatea neuronală, ca și de coordonarea funcției neuronilor cu cea a nevrogliilor.

• *Controlul mediului extraneuronal.* O funcție glială posibilă, sugerată de studiile de neurohistologie clasică, este aceea că nevrogliile ar exercita un control al conținutului spațiului extraneuronal. Cercetările recente atestă importanța compoziției lichidului din spațiul perineuronal pentru transmisia impulsului nervos și pentru transmisia sinaptică. În prezent, pare clar că mediul extraneuronal (fluidul care înconjură neuronii) este similar cu lichidul cerebro-spinal și nu cu plasma sanguină. În cele ce urmează ne vom opri asupra cîtorva probleme legate de implicarea celulelor gliale în reglarea compoziției mediului extraneuronal. Problema rolului nevrogliei în bariera hematoencefalică o vom aborda însă la sfîrșitul capitolului.

• *Mișcarea substanțelor în spațiul intercelular.* Lărgimea spațiului perineuronal, așa cum apare el la microscopul electronic, este de aproximativ 15—20 nm și aceasta nu constituie o piedică în difuzia liberă a moleculelor mici cum sînt electroliții și sucroza. De asemenea citoplasma celulelor nevroglice nu este un mediu important pentru mișcarea ionilor (în spațiul perineuronal), deoarece potențialul de repaus nevroglial, care este dependent de o concentrație intracelulară mare a potasiului, nu se modifică în timpul deplasării electroliților în spațiul perineuronal. De aceea se poate conchide că spațiul intercelular este principala cale pentru schimbul de molecule mici în sistemul nervos și că piedica reprezentată de spațiul foarte îngust nu are mare importanță.

Celulele gliale modifică mediul extraneuronal prin *prevenirea difuzării potasiului de la suprafața neuronului*, ca urmare a unor repetate potențiale de acțiune.

• *Tamponarea potasiului.* Nevrogliile pot juca un rol important în redistribuirea potasiului în spațiul intercelular. Pe această cale este posibil ca potasiul să fie transferat din regiuni cu concentrații ridicate (ca urmare a unor repetate stimulări ale celulelor nervoase, îndeosebi în regiunile bogate

Scanned with OKEN Scanner

în axoni nemielinici) în regiuni cu concentrații mai scăzute și astfel să fie prevenită reducerea transmisiei influxului nervos. Nevrogliile pot interveni în reechilibrarea concentrației potasiului între două regiuni datorită sinapselor de tip *gap* existente între ele. S-a sugerat că o prăbușire a proprietății de a tampona acumularea regională a potasiului ar juca un rol în patogenia epilepsiei focale. Trebuie precizat că eficiența sistemului glial de tamponare a potasiului depinde nu numai de proprietățile speciale ale membranei celulei nevroglice, ci și de geometria specială a acestor celule.

• *Inactivarea neurotransmițătorilor.* Celulele nevroglice mai sînt implicate și în inactivarea unor neurotransmițători, îndeosebi a celor care acționează la distanță, cum sînt catecolaminele, sistemul GABA etc.

În sfîrșit, celulele nevroglice sînt larg implicate în procese mai complexe din sistemul nervos ca degenerarea, regenerarea și histogeneza.

9.4. FIBRELE NERVOASE (NEUROFIBRA)

9.4.1. TIPURILE DE FIBRE NERVOASE

Fibrele nervoase sînt structuri nervoase alcătuite din două componente principale: axonii sau prelungirile neuronale și tecile nevroglice. Fibrele nervoase constituie fasciculele nervoase (din creier sau din măduva spinării) și nervii periferici. Teaca externă din jurul fibrelor nervoase peri-

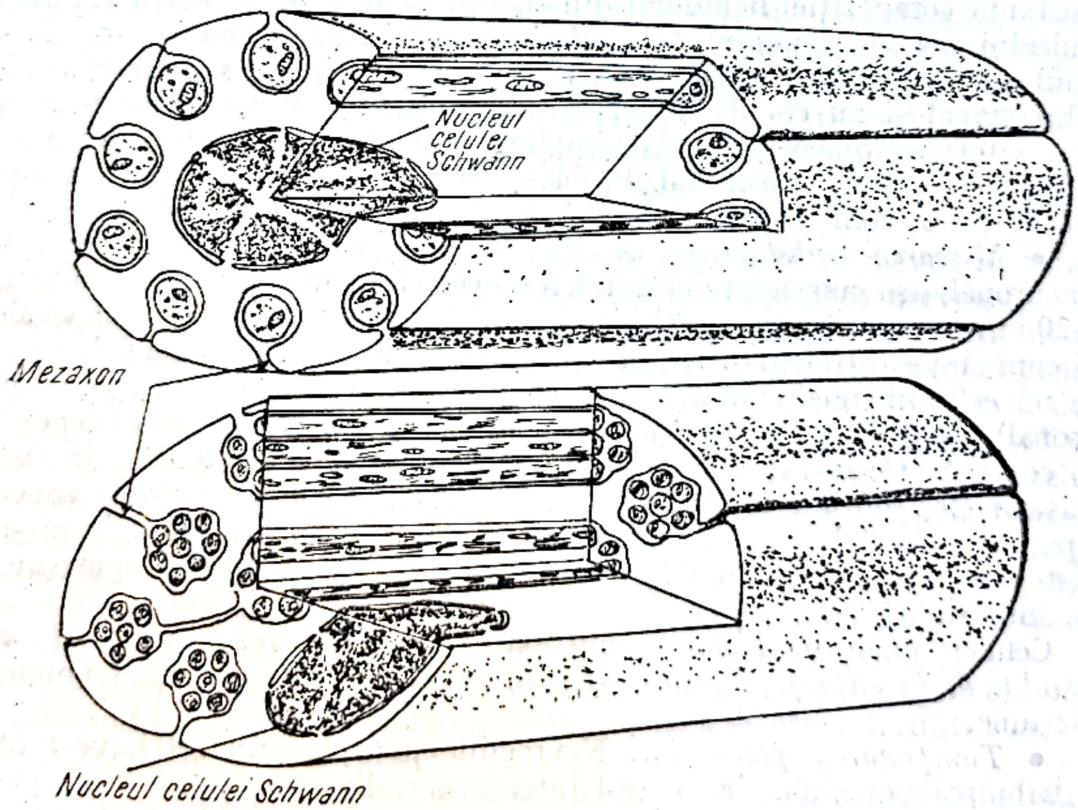


Fig. 9.20. — Schema fibrelor nervoase amielinice:
sus — tipul cel mai frecvent; *jos* — cîte un mezaxon pentru mai mulți axoni.

Scanned with OKEN Scanner

ferice este alcătuită din celulele Schwann iar fibrele din sistemul nervos central sînt învelite de oligodendrocite. Numeroși axoni din țesutul nervos adult sînt înveliți de cîteva lame intermediare, elaborate de către învelișul exterior de celule nevroglice. Axonii cu diametru mic sînt de obicei fibre nervoase nemielinizate (fig. 9.20 și 9.21). Pe măsură ce devin mai groși, axonii sînt

Fig. 9.21. — Imagine electronomicroscopică × 3 300; *ax 1* — o fibră nervoasă amielinică secționată oblic și cufundată în citoplasma celulei Schwann *(CS)*; *ax 2* — alături o fibră nervoasă mielinică secționată longitudinal.

înfășurați de teaca intermediară de mielină, care are o structură membranară multilamelară compactă, elaborată de celulele nevroglice de acoperire. Atunci cînd pe lîngă tecile externe formate de celulele nevroglice mai sînt învelite și de un strat intermediar de teacă mielinică, fibrele sînt cunoscute sub denumirea de nervi mielinici (fig. 9.22 și 9.23). Teaca de mielină este sintetizată

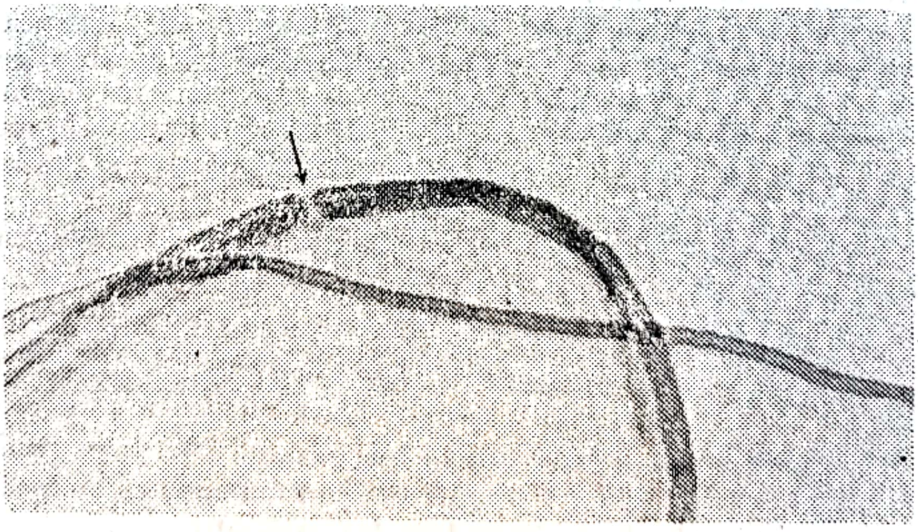


Fig. 9.22. — Axon mielinic colorat cu tetraoxid de osmiu; săgeata indică nodul Ranvier.

Scanned with OKEN Scanner

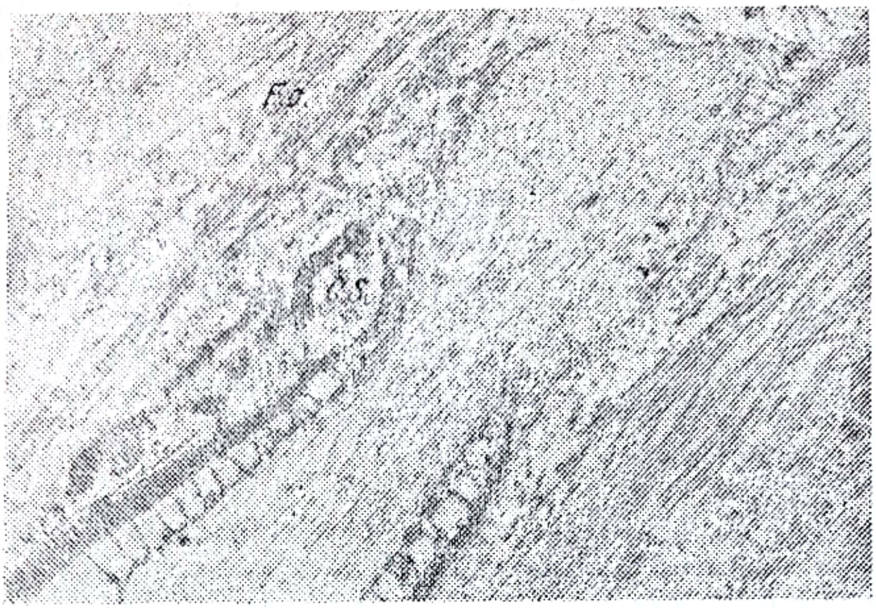


Fig. 9. 23. — Ultrastructura fibrei mielinice la nivelul nodului Ranvier și a zonei paranodale × 4 200:
SC — celule Schwann; *Fc* — fibre de colagen.

și asamblată de oligodendrocite în sistemul nervos central și de celulele Schwann în sistemul nervos periferic.

Conducerea impulsului axonal este mai rapidă în axonii mai mari și cu teacă mielinică mai groasă. Importanța tecii de mielină are o explicație simplă: ea este un izolator electric care accelerează conducerea impulsului nervos. Viteza de conducere a impulsului nervos într-un nerv fără teacă de mielină crește cu aproximativ rădăcina pătrată a diametrului său, așa încît pentru a-și dubla viteza de conducere, o fibră amielinică trebuie să fie de patru ori mai groasă. Spre deosebire de aceasta, viteza de conducere a fibrelor nervoase cu teacă de mielină crește proporțional cu diametrul fibrei, astfel încît pentru a se dubla viteza de conducere este necesară doar dublarea diametrului fibrei. La un mamifer cu temperatura de 37°, o fibră nervoasă nemielinică ar trebui să aibă o grosime de mai mulți milimetri pentru a conduce impulsul nervos cu o viteză de 100 m/s, în timp ce o fibră mielinică ce conduce cu aceeași viteză are un diametru de numai aproximativ 20 μm. Un alt exemplu: dacă măduva spinării ar fi alcătuită numai din fibre nervoase amielinice, ea ar trebui să fie groasă de mai mulți metri pentru a-și putea menține aceeași viteză de conducere nervoasă.

Un alt avantaj al fibrei nervoase mielinice este consumul mai redus de energie. Fibra nervoasă mielinică de broască, cu diametrul de 12 μm, conduce impulsul nervos cu o viteză de 25 m/s. Pentru aceeași viteză de conducere, fibra nervoasă nemielinizată de arici de mare este groasă de 500 μm și consumă de 5 000 de ori mai multă energie. Dacă mielina are un dezavantaj, acesta constă în faptul că ea se formează foarte încet. Pierderea tecii de mielină sau alterarea celulelor care o produc este un fenomen ce apare în cadrul afecțiunii cunoscute sub denumirea de scleroză multiplă.

Fibrele mielinice proaspete apar ca cilindri albi, omogeni și strălucitori.

Scanned with OKEN Scanner

În sistemul nervos periferic celulele Schwann, care constituie tecile externe ale fibrelor nervoase, trimit prelungiri membranare lamelare care formează straturi concentrice compacte în jurul axonului, ce alcătuiesc așa-numita teacă de mielină. Din punct de vedere chimic mielina este un complex

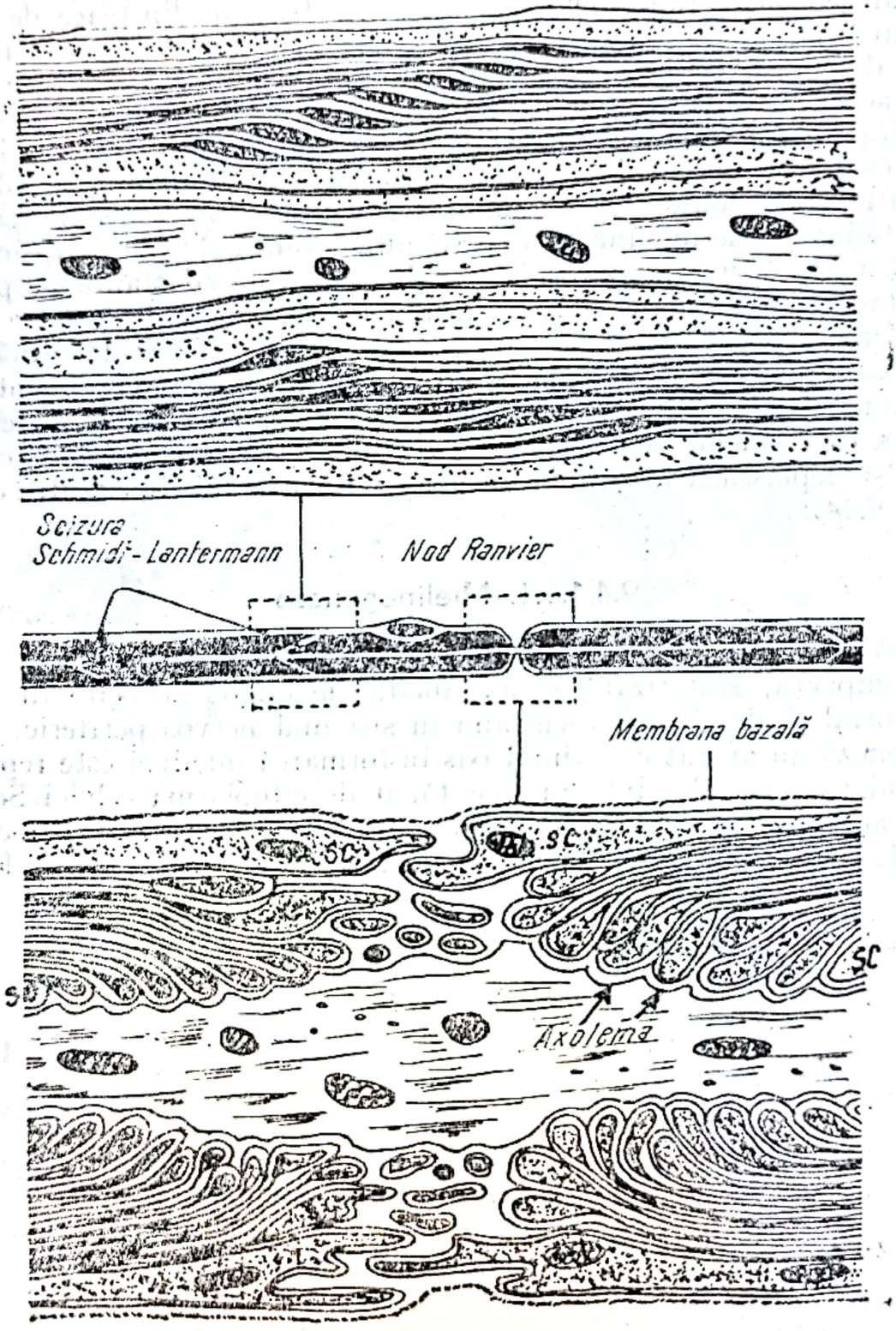


Fig. 9. 24. — În centrul figurii, fibra nervoasă periferică așa cum se descrie după microscopul optic:
sus — ultrastructura tecii de mielină la nivelul scizurii Schmidt Lantermann; *jos* — ultrastructura nodului Ranvier și a zonei paranodale.

Scanned with OKEN Scanner

lipoproteic care este parțial dizolvat (componenta lipidică) prin tehnicile histologice clasice. Prezența sa poate fi demonstrată prin impregnare cu tetraoxid de osmiu care conservă mielina și o colorează în negru (vezi fig. 9.22 și 9.23).

Un axon periferic este înconjurat de mielina formată de un șir de celule Schwann, dispuse „în serie" de la un capăt la altul al fibrei nervoase, astfel încît fiecare celulă Schwann elaborează cîte un tronson din teaca de mielină a axonului (vezi fig. 9.24). Teaca de mielină prezintă discontinuități în lungul său, denumite *noduri Ranvier* care reprezintă spațiile dintre celulele Schwann adiacente din lungul axonului. La nivelul nodului Ranvier, membrana axonului (axolema) prezintă un strat intern de material dens la fluxul de electroni care formează o densificare subaxolemală. Segmentul de fibră nervoasă dintre două noduri este denumit segmentul *internodal* și la acest nivel axonul este învelit de mielină și de o singură celulă Schwann. Grosimea tecii de mielină variază după diametrul axonului însă este constantă pe parcursul unui anumit axon. Lungimea segmentului internodal variază între 0,08 și 1 mm. La microscpul optic teaca de mielină prezintă scizuri de formă conică, denumite *scizurile Schmidt-Lantermann*. Ele reprezintă distanțări între membranele lamelor de mielină care se datorează unor mici acumulări de matrice citoplasmică a celulelor Schwann. Aceste acumulări citoplasmice de la nivelul scizurilor se deplasează în sus sau în jos pe teaca de mielină dintre două noduri (fig. 9.24).

9.4.1.1.1. Mielinogeneza

După cum am arătat, mielina este o structură membranară multilamelară compactă, sintetizată și asamblată de oligodendrocite în sistemul nervos central și de celulele Schwann în sistemul nervos periferic. Studiile de histogeneză au arătat că primul pas în formarea mielinei este reprezentat de pătrunderea axonului într-un șanț făcut de citoplasma celulei Scwhann. Marginile acestui șanț se alătură pentru a alcătui un mezaxon, așa încît membranele plasmatice ale celor două margini fuzionează între ele prin fețele lor

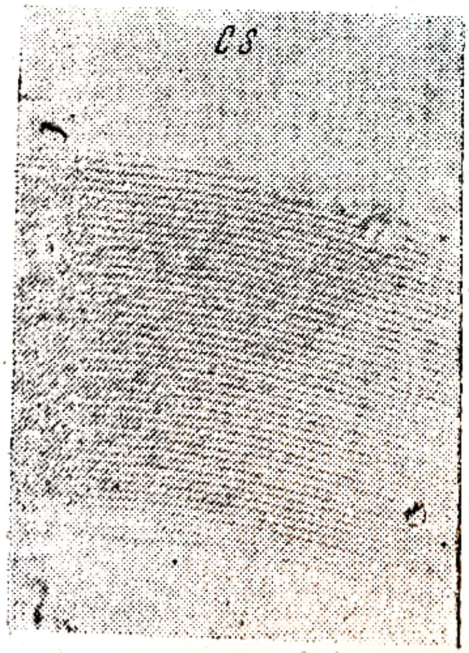


Fig. 9. 25. — Ultrastructura tecii de mielină în secțiune transversală X 16 000:
CS — citoplasma celulei Schwann.

Scanned with OKEN Scanner

externe. După fuzionarea fețelor externe ale membranelor celulare, vor rezulta așa-numitele *linii interperiodice* ale tecii de mielină, observate în secțiuni la microscopul electronic (fig. 9.25). Din fuzionarea fețelor interne ale membranelor rezultă așa-numitele *linii dense principale*. În etapa următoare a mielinogenezei, printr-un proces încă incomplet clarificat, mezaxonul se înfășoară în jurul axonului de mai multe ori. Numărul de înfășurări determină numărul de lame mielinice (fig. 9.26). După ce procesul de formare a tecii de mielină s-a terminat, se poate recunoaște un mezaxon intern și unul extern.

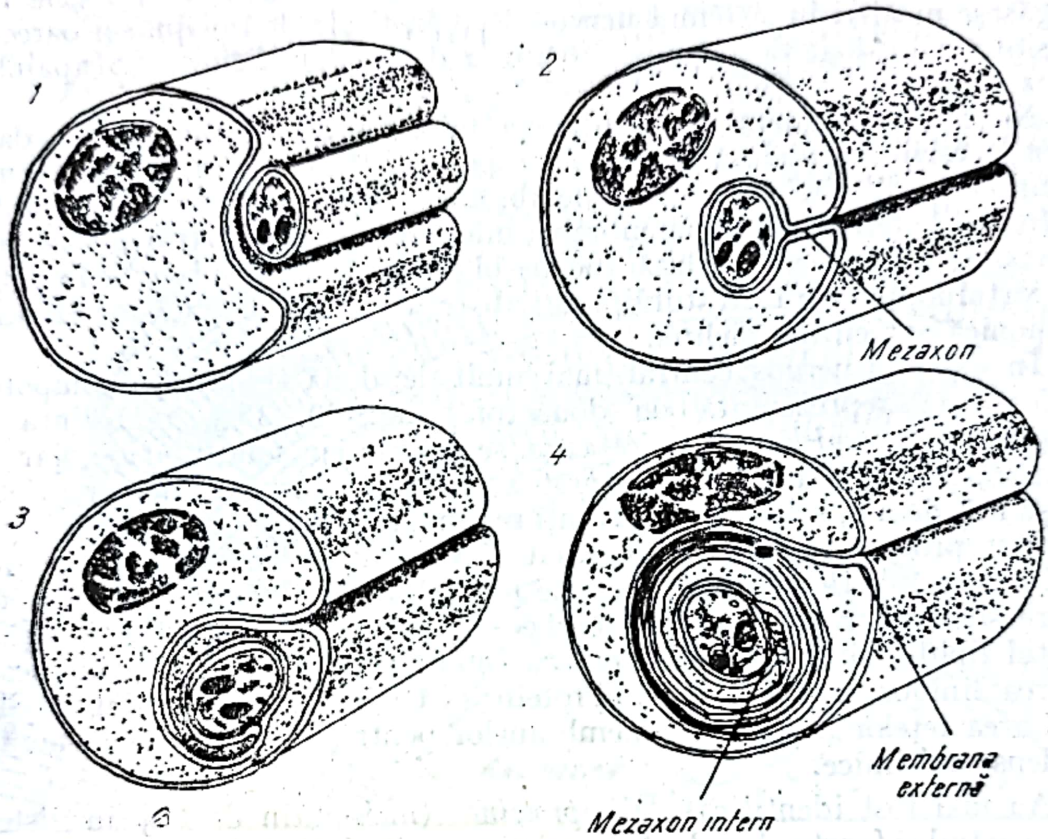


Fig. 9. 26. — Formarea tecii de mielină: schema a patru faze consecutive.

Fragmentele citoplasmice ce constituie scizurile Schmidt-Lantermann nu sînt altceva decît porțiuni mici de citoplasmă din celulele Schwann care au rămas în cursul înfășurării lamelor mielinice.

În apropierea nodului Ranvier, tecile de mielină se termină „în registru", prin răsfrîngerea și formarea unei bucle care stabilește joncțiuni strînse cu axolema. Acest proces începe cu lama mielinică cea mai internă, care se răsfrînge în punctul cel mai îndepărtat de nodul Ranvier, și se termină cu lama cea mai externă, care face joncțiunea cu neurilema în imediata vecinătate a zonei nodale. În consecință, zona internodală se împarte în subzone — cea *intermediară* și cea *paranodală* (vezi fig. 9.24).

9.4.1.1.1.1. *Compoziția moleculară a mielinei*

Cel mai evident aspect al compoziției mielinei în raport cu compoziția membranelor de la suprafața altor celule (de exemplu cu membrana hepatocitelor) este *proporția mare de lipide* față de proteine. Astfel, mielina este alcă-

Scanned with OKEN Scanner

tuită din circa 64% lipide, 30% proteine și 6% glucide (care sînt asociate cu lipide și proteine) iar membrana hepatocitelor — din 41% lipide, 58% proteine și 1% glucide. Datorită conținutului său ridicat în lipide, apa și electroliții (inclusiv sodiul și potasiul) sînt excluși și, datorită acestui conținut lipidic, mielina funcționează efectiv ca un izolator. Ca și în celelalte membrane plasmatice, *lipidele* sînt reprezentate de colesterol, fosfolipide și glicolipide. O glicolipidă, denumită *galactocerebrozidă* (care încorporează în structura sa galactoza) reprezintă singură circa 20% din totalul greutății uscate a mielinei și 6% din greutatea uscată a creierului uman. Galactocerebrozidele nu se mai găsesc nicăieri în sistemul nervos decît în tecile de mielină, deoarece ele sînt sintetizate doar de oligodendrocite și de celulele Schwann, capabile să formeze teci de mielină.

Nu numai componenta lipidică a mielinei este caracteristică dar și *proteinele* tecii de mielină prezintă proprietăți specifice. Așa de exemplu, în timp ce în diferitele tipuri de membrane plasmatice componenta proteică este foarte heterogenă, în membrana mielinică există foarte *puține tipuri de proteine*. Trebuie semnalată îndeosebi lipsa proteinelor care facilitează transportul ionic prin bistratul lipidic; absența acestora explică impermeabilitatea ionică a tecii de mielină.

În sistemul nervos central, mai mult de două treimi din componenta proteică este reprezentată de două proteine: 30—35% reprezintă așa-numitele *proteine mielinice bazice* care se extrag cu soluții acide, iar 50% este reprezentat de așa-numitele *proteine proteolipidice* care au proprietatea neobișnuită de a fi solubile în solvenți organici.

Atît proteinele proteolipidice cît și proteinele mielinice bazice joacă un rol structural (fig. 9.27). Proteinele proteolipidice sînt proteine transmembranare și au patru domenii hidrofobe suficient de mari pentru a străbate bistratul lipidic și un domeniu extern intens încărcat pozitiv, implicat în formarea liniilor interperiodice. Proteinele bazice sînt probabil implicate în atașarea fețelor interne ale membranelor pentru a organiza așa-numitele linii dense mielinice.

Au mai fost identificate *glicoproteine* (mai puțin de 1% în sistemul nervos central și foarte abundente în mielina periferică) și cîteva *enzime*, dintre care pot fi semnalate *enzime care catalizează* sinteza sau degradarea lipidelor mielinice, *anhidraza carbonică*, precum și 2, 3, 5-nucleotidfosfohidrolaza. Aceasta din urmă reprezintă cca 5% din totalul proteinelor.

Aproximativ 50% din proteinele prezente în teaca de mielină a fibrelor nervoase periferice este reprezentată de așa-numita *glicoproteină* P_0 sau glicoproteina asociată mielinei. Proteina P_0 este specifică celulelor Schwann, ea nefiind sintetizată de oligodendrocitele din sistemul nervos central. Ea este o glicoproteină integrală a membranei mielinice schwanniene, cu o greutate moleculară de 28—30 Kd. S-a sugerat că P_0, ca proteină amfipatică, servește ca element structural pentru legarea lamelelor adiacente și, prin aceasta, ca element-cheie în stabilizarea ansamblului tecii de mielină (vezi fig. 9.27). Defecțiuni în expresia genetică a sintezei acestei proteine de către celulele Schwann au drept consecință tulburări grave în mielinizarea nervilor periferici. Pe lîngă glicoproteina P_0, în membranele lamelelor mielinice mai sînt prezente *proteinele mielinice bazice*. Ele sînt prezente în fibrele mielinice periferice în asociație cu glicoproteina P_0 și mai sînt desemnate ca proteinele P_1. Proteinele bazice sînt endoproteine, adică pro-

Scanned with OKEN Scanner

teine localizate pe fața citoplasmatică a membranelor, sintetizate de celulele Schwann și, respectiv, de oligodendroglii. În tecile de mielină, proteinele bazice sînt localizate la nivelul liniilor dense principale.

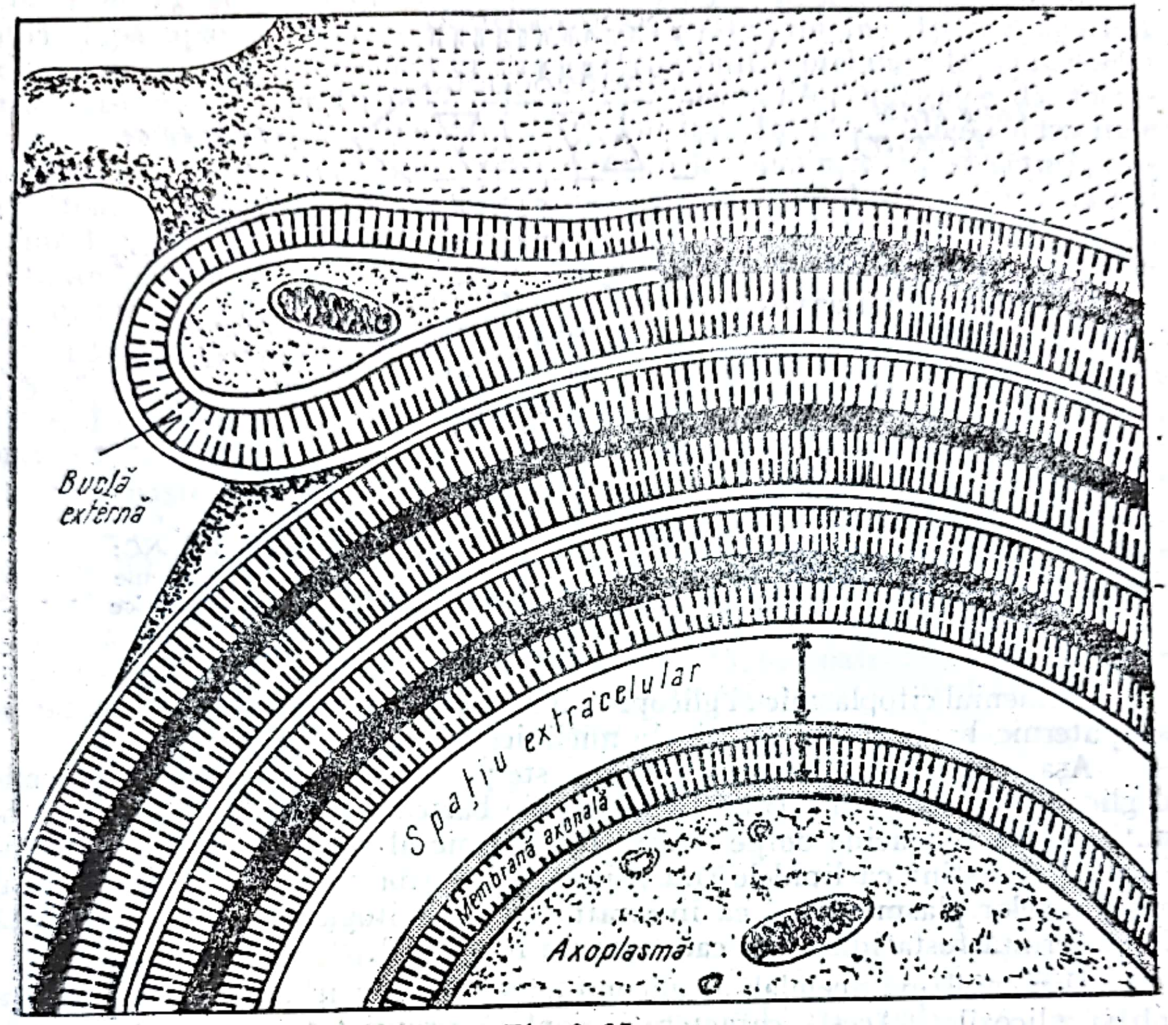


Fig. 9. 27. a

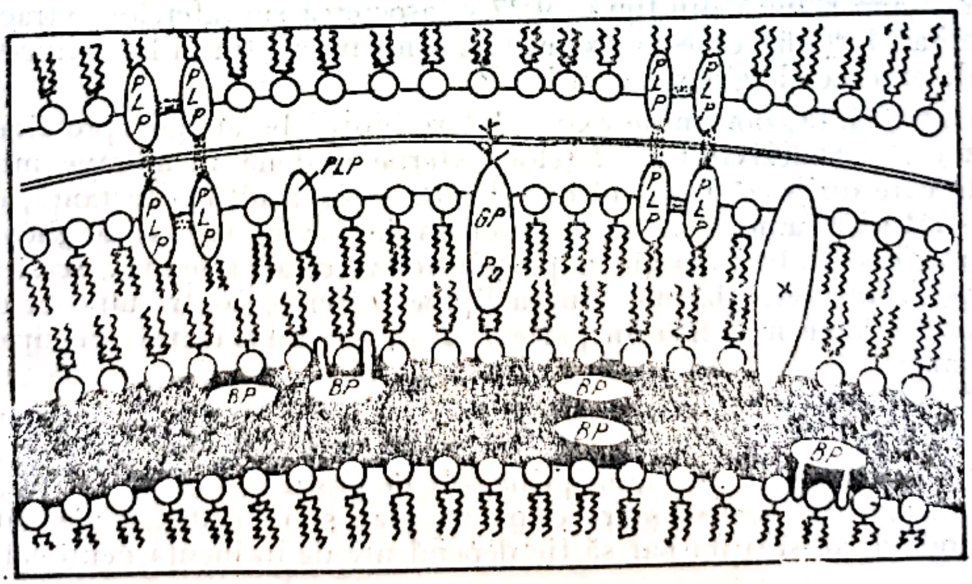


Fig. 9. 27. b

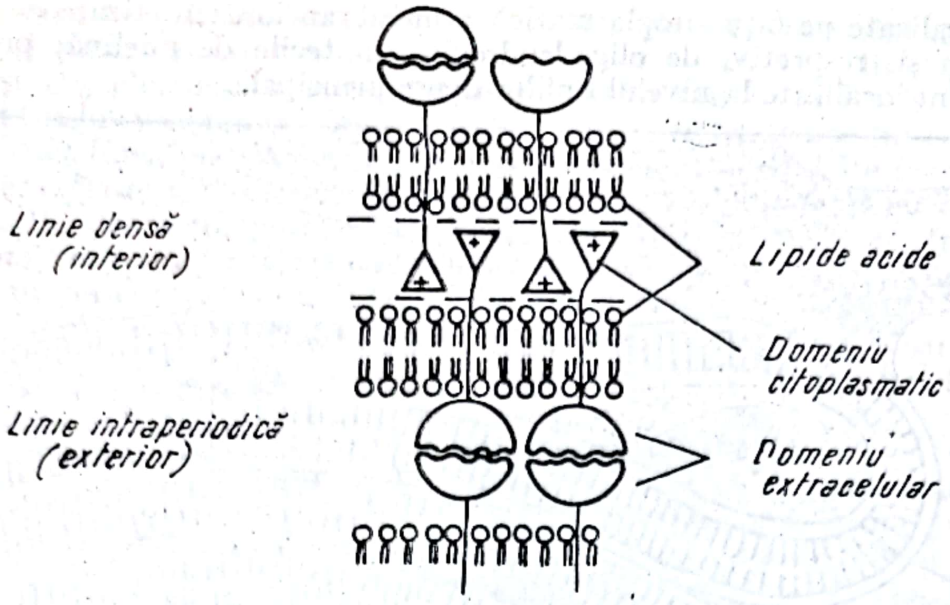


Fig. 9. 27. c

a — Organizarea lamelor mielinice; *b* — organizarea moleculară în SNC: *GP-P_0* — glicoproteina Po; *BP* — proteina bazică; *PLP* — proteine proteolipidice; *c* — orientarea glicoproteinei Po în lamele mielinice periferice (vezi textul).

Domeniul citoplasmic al glicoproteinei transmembranare P_0 are un caracter puternic bazic (ca și proteinele mielinice bazice).

Așa cum rezultă din figura 9.27 c, este probabil că domeniul citoplasmic al glicoproteinei P_0 (împreună cu proteinele bazice) să interacționeze electrostatic cu lipidele acide de pe stratul citoplasmic al bistraturilor lipidice alăturate. Este știut că lipidele sînt asimetric distribuite în bistratul lipidc al membranelor plasmatice și că în stratul intern (citoplasmic) este cantonată de preferință fosfatidilserina care este un lipid acid.

Domeniul extracelular al glicoproteinei P_0 este în același timp hidrofob și glicozilat. Aceste caractere îi conferă proprietatea de „autoadezivitate". Așa cum rezultă din figura 9.27 c, asocierea suprafețelor extracelulare ale membranelor adiacente se produce pe calea interacțiunii homofilice dintre domeniile externe ale glicoproteinelor P_0.

În consecință, domeniile extracelulare hidrofobe ale glicoproteinelor P_0 determină „autoadezivitatea" fețelor externe a două membrane mielinice adiacente care dirijează procesul de înfășurare și, în ultimă instanță, de așezare în straturi a lamelor alăturate. Domeniile interne bazice ale glicoproteinei P_0 funcționează în asociație cu proteinele bazice ale mielinei. Acestea acționează pe frontul citoplasmic asupra lipidelor acide, contribuind la organizarea fiecărei lame mielinice în parte și realizînd linia densă principală din miezul lamei.

Biogeneza principalelor molecule mielinice (J. cell. Biol., 1986, *102*, 384—392). Succesiunea apariției în timp, localizarea intraglială și faza acumulării maxime a celor trei tipuri principale de proteine mielinice și a galactocerebrozidelor (GC) se desfășoară după un plan similar atît *in vivo* cît și *in vitro*; totodată, acestea nu par să fie dependente de influența neuronală continuă.

Scanned with OKEN Scanner

S-a constatat că *oligodendrocitele* cultivate *in vitro* în absența neuronilor, sintetizează în mod constant trei tipuri de proteine mielinice: *proteinele mielinice bazice (PMB), glicoproteinele mielinice asociate (GMA)* sau proteinele P_0 și *proteinele lipoproteice (PLP)* — la aproximativ o săptămînă după apariția galactocerebrozidelor. Aceste proteine își fac apariția numai după ce oligodendrocitele și-au stabilit prelungirile (procesele) caracteristice, care participă la transportul proteinelor mielinice la membranele mielinice prin intermediul veziculelor. În plus, oligodendrocitele cultivate *in vitro* asamblează activ proteinele mielinice în structuri asemănătoare mielinei, cu toate că sînt absenți din mediul de cultură axonii în jurul cărora se înfășoară lamele mielinice *in vivo*. În consecință, datele obținute în astfel de culturi *in vitro*, sînt semnificative pentru înțelegerea mecanismelor moleculare după care se desfășoară mielinogeneza *in vivo*.

PMB, GMA și PLP sînt detectate în oligodendrocite *in vitro*, de regulă la 5—7 zile după naștere, indiferent cînd au fost prelevate glicocitele din creier. În mod similar GC apar întotdeauna în jurul nașterii *(Dev. Biol.*, 1981, *83*, 301—310). Cele mai multe oligodendrocite elaborează PMB la 5—6 zile după naștere, acestea sînt urmate imediat de GMA și, după o perioadă de încă 1—2 zile, de PLP. O anumită fracțiune de oligodendrocite care corespund probabil unor fascicule de fibre diferite din creier, elaborează proteinele mielinice în aceeași ordine, însă după un interval de timp mai lung. Astfel, se pot întîlni cazuri cînd PMB sînt elaborate după circa 10 zile de la naștere, GMA pînă la 15 zile și PLP pînă la 19 zile. În cosecință, se poate conchide că sinteza fiecărui tip de proteină mielinică este reglată prin mecanisme diferite.

Observațiile *in vivo* dovedesc că PMB sînt inițial detectabile în citoplasma oligodendrocitelor înainte de începerea mielinizării, ulterior apar în prelungirile celulare și, în final, în lamele mielinice. PMB sînt observate pentru prima oară în creier la vîrsta de 5 zile și în comisura anterioară a șobolanului la vîrsta de 5—7 zile. Așadar apariția în timp a PMB *in vitro* este similară celei observate *in vivo*. Aspectul difuz al colorației citoplasmice (prin metodele de imunomarcare) a PMB (observabile atît *in vivo* cît și *in vitro)* dovedesc faptul că acest tip de proteine mielinice sînt sintetizate pe ribozomii liberi. Un alt studiu asupra sintezei PMB din creierul intermediar de șobolan, în vîrstă de 12—30 de zile, sugerează de asemenea că polizomii liberi continuă să sintetizeze PMB în cursul procesului de mielinizare ce se desfășoară *in vivo*.

În culturile *in vitro* de oligodendrocite, GMA pot fi identificate întîi în zona perinucleară, localizare care corespunde cu stadiul Golgi, și imediat apoi în procesele celulare, unde sînt transportate pe calea veziculelor. GMA au fost identificate și *in vivo*, la scurt timp după PMB (într-o perioadă de 7—12 zile de la naștere), în oligodendrocitele comisurii anterioare a creierului. În acest din urmă stadiu, citoplasma se colorează difuz, iar prelungirile celulare prezintă reacția de aspect granular. Acest aspect al reacției din prelungirile celulare dovedește că GMA este transportată la lamele mielinice pe calea veziculelor citoplasmice. În concluzie, locurile intracitoplasmice în care au fost detectate GMA în oligodendrocitele în culturi, sînt foarte asemănătoare cu cele care se întîlnesc *in vivo*. Timpul de colorare maximă a oligodendrocitelor *in vivo*, ca și numărul de celule devenite reactive *in vitro*, survin pentru GMA, după PMB.

Scanned with OKEN Scanner

PLP (proteinele lipoproteice), poteine mielinice majore care sînt implicate în compactizarea și stabilizarea mielinei, au fost și ele detectate în oligodendrocitele cultivate fără neuroni, însă ele apar de regulă mai tîrziu decît PMB și GMA. În mod similar, *in vivo*, sinteza maximă de PLP survine la cîteva zile după PMB.

PMB și, într-o mai mică măsură PLP, pot fi văzute în prelungirile oligodendrocitelor cultivate *in vitro* numai la circa o săptămînă după apariția lor în citoplasma glială. Aceste proteine au fost parțial colocalizate cu GC în membranele mielinice ale prelungirilor gliale. Studiile efectuate *in vivo* au dovedit că în unele fascicule nervoase speciale, sînt necesare 6—12 zile pentru ca PMB să se deplaseze din citoplasma corpului celular pînă la prelungirile oligodendrocitelor de la nivelul mielinei internodale. Nu se cunosc încă factorii care controlează direcția și rata transportului PMB și PLP. Este posibil ca semnalele neuronale să fie necesare pentru transportul eficient al PMB și PLP (nu însă și al GMA) din citoplasma perinucleară în prelungirile gliale.

Spre deosebire de oligodendrocite, *celulele Schwann* ale nou-născuților au neapărată nevoie de influența neuronilor și a propriei membrane bazale, pentru a elabora teaca de mielină a fibrelor din sistemul nervos periferic. Atunci cînd sînt cultivate izolat *in vitro*, celulele Schwann stopează în cîteva zile elaborarea GC de suprafață, precum și proteinele mielinice. Totuși reelaborarea GC și a unor proteine mielinice poate fi indusă prin adăugarea de dibutiril-AMP-ciclic sau a fracțiunilor de axolemă, la culturile pure de celule Schwann. Acestea dovedesc dependența nemijlocită a celulelor Schwann de factori hormonali și/sau neuronali, pentru a putea elabora componentele mielinice.

Diferențele în mecanismul biogenezei principalelor molecule mielinice între celulele Schwann și oligodendrocite se află la baza comportării diferite în cursul regenerării a fibrelor nervoase periferice față de cele centrale.

9.4.1.1.2. Celulele Schwann

Celulele Schwann au nuclei alungiți, dispuși paralel cu axonul. Ca și teaca de mielină, celulele Schwann iau o formă cilindrică. Nodurile Ranvier care sînt indentații ale tecii de mielină, sînt acoperite de întrepătrunderea unor procese digitiforme de la celulele Schwann adiacente.

În *sistemul nervos central* nu se află celule Schwann. Aici teaca de mielină este formată de către *oligodendrocite*. Spre deosebire de celulele Schwann, mai multe ramuri ale oligodendrocitelor sînt trimise pentru a edifica teaca de mielină în jurul mai multor axoni (fig. 9.28). Oligodendrogliile nu trimit prelungiri digitiforme pentru a acoperi zona nodului Ranvier, care rămîne neacoperită în sistemul nervos central. În alcătuirea lamelor de mielină nu intră moleculele glicoproteice P_0, ci numai molecule *proteice mielinice* bazice care reprezintă circa o treime din totalul proteinelor mielinice.

9.4.1.2. Fibrele nemielinice

Atît în sistemul nervos central cît și în cel periferic, nu toți axonii sînt înfășurați în teci de mielină. În sistemul nervos periferic, toți *axonii nemielinici* sînt înfășurați în lame simple de celule Schwann. Spre deosebire de axonii mielinici, o celulă Schwann poate să înfășoare mai mulți axoni amielinici.

Scanned with OKEN Scanner

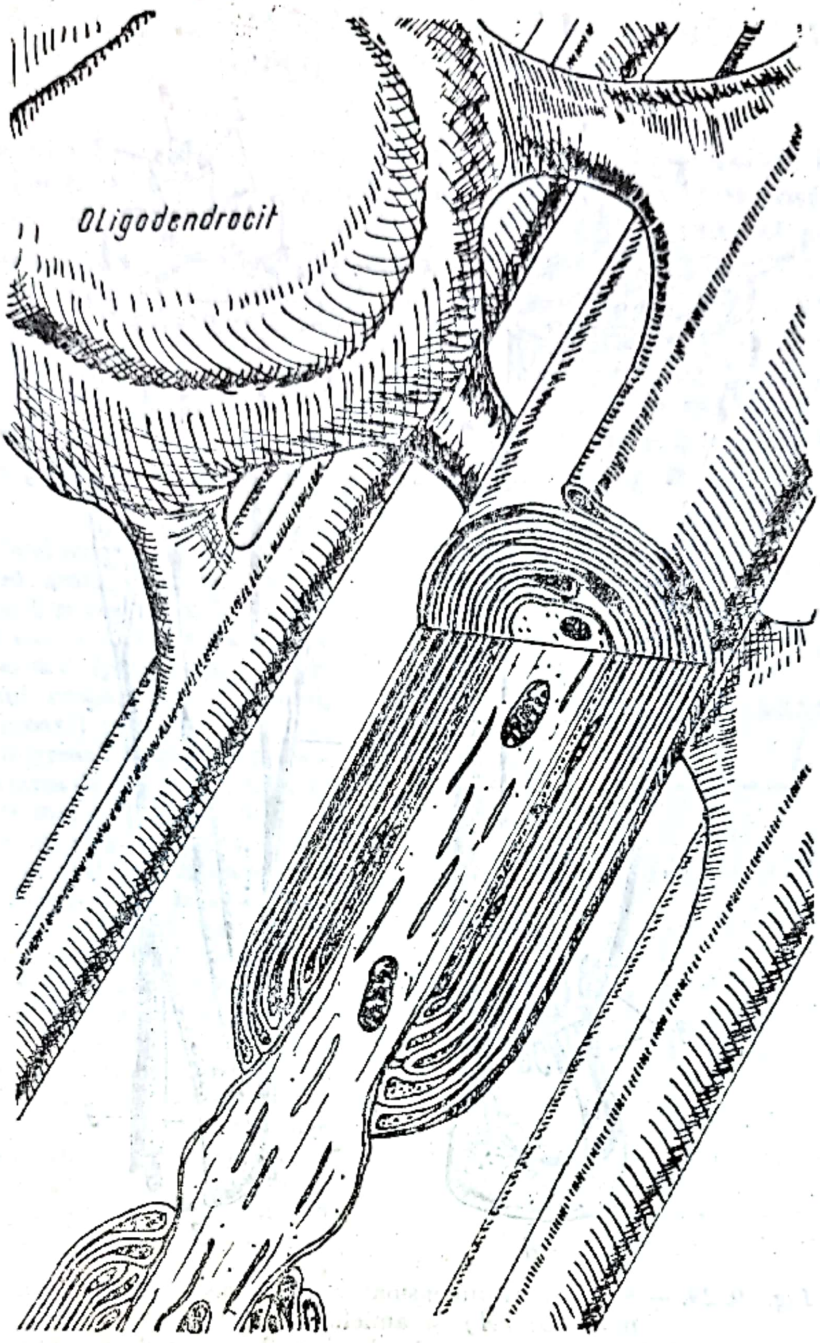


Fig. 9.28. — Reprezentarea schematică a oligodendrogliilor și a fibrelor mielinice în sistemul nervos central.

Fibrele nervoase nemielinice nu au noduri Ranvier, deoarece celulele Schwann învecinate se unesc prin prelungirile lor laterale pentru a forma o teacă continuă (fig. 9.29).

Sistemul nervos central este bogat în axoni amielinici, însă acești axoni, spre deosebire de cei periferici, nu sînt înveliți în teci. În creier și în măduva spinării, prelungirile axonale nemielinizate se află exclusiv în substanța cenușie și se pun în contact liber cu prelungirile celulelor nevroglice sau cu alți axoni.

Scanned with OKEN Scanner

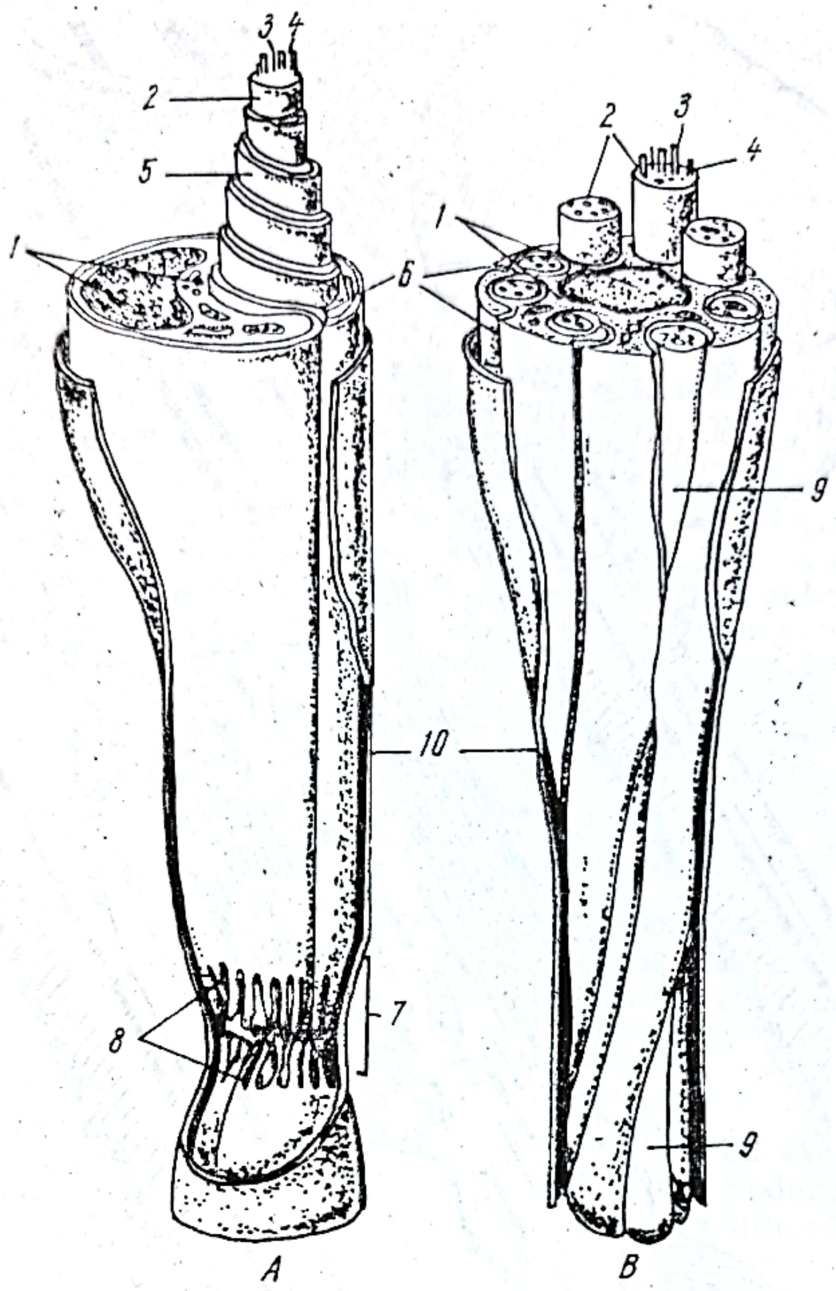


Fig. 9. 29. — Schema tridimensională a ultrastructurii fibrei mielinice *(A)* și amielinice *(B)*:
1 — nucleul și citoplasma celulei Schwann; *2* — axonul; *3* — microtubulii; *4* — neurofilamentele; *5* — teaca de mielină; *6* — mezaxonul; *7* — nodul Ranvier; *8* — interdigitațiile prelungirilor Schwann la nivelul nodului Ranvier; *9* — vedere laterală a unei fibre nemielinizate; *10* — lamina bazală.

9.5. HISTOFIZIOLOGIA ȚESUTULUI NERVOS

Funcția integrativă a țesutului nervos depinde în esență de generarea și transmiterea impulsului nervos, precum și de producerea de către celulele nervoase și/sau de celulele asociate a unor molecule (ca neurotransmițătorii, encefalinele, factorii de creștere, moleculele de adezivitate etc.) care controlează adezivitatea, creșterea și plasticitatea relațiilor interneuronale.

Scanned with OKEN Scanner

9.5.1. BAZELE MOLECULARE ALE TRANSMITERII IMPULSULUI NERVOS

Conducerea axonală a impulsului nervos este problema de bază a țesutului nervos cel mai bine elucidată. Mai multe componente au fost incriminate în procesul de transmitere a impulsului nervos, însă în prezent este bine stabilit că rolul-cheie este jucat de membrana neuronală.

Trecerea impulsului este caracterizată de schimbări în permeabilitatea membranei, urmate de pătrunderea sodiului în celulă și de ieșirea potasiului. Deoarece permeabilitatea pentru sodiu este mai mare decît cea pentru potasiu, ionii pozitivi se acumulează pe fața internă a membranei celulare. Ca urmare, în timpul propagării impulsului fața externă a membranei axonale devine încărcată negativ *în raport* cu fața internă (fig. 9.30).

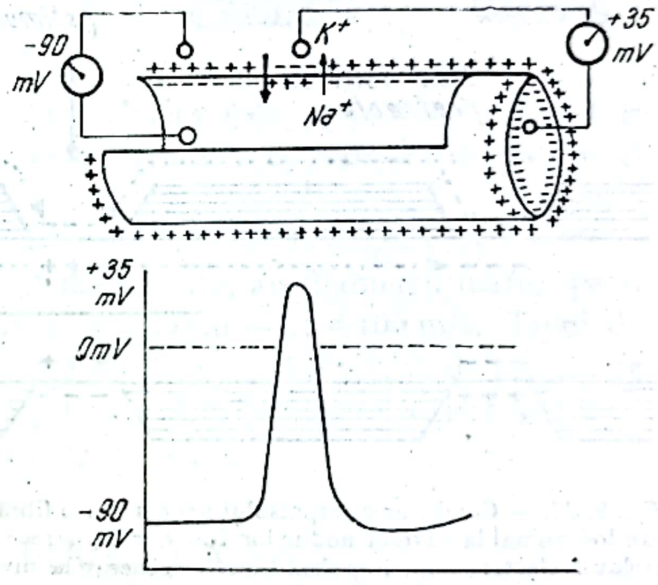


Fig. 9.30. — Conducerea impulsului nervos într-o fibră amielinică. În repaus, între fața externă și cea internă a membranei axonale există o diferență de potențial de — 90 mV (potențialul de repaus). În cursul propagării impulsului, Na^+ (săgeata groasă) pătrunde în axon, în timp ce K^+ migrează în direcție opusă. Deoarece cantitatea de sodiu care pătrunde în axon este mai mare decît cantitatea de potasiu care iese, se produce o schimbare a polarității membranei: ea devine relativ pozitivă pe fața internă. În consecință, potențialul de repaus este înlocuit de potențialul de acțiune care, în cazul exemplului din figură, este de + 35 mV. În fibra nemielinică impulsul nervos este un val de schimbări în permeabilitatea membranei, care se propagă în lungul fibrei și provoacă eliberarea transmițătorilor chimici cînd ajunge la nivelul terminației axonale. În grafic, este figurat schematic ceea ce se înregistrează de către un osciloscop catodic, în cursul trecerii unui impuls nervos printr-un mic segment de fibră nervoasă amielinică.

În *fibrele amielinice* impulsul se propagă „în val" ca urmare a modificării permeabilității membranare din aproape în aproape. De îndată ce valul de depolarizare se deplasează în lungul fibrei, membrana din spatele valului revine la stadiul său de repaus. Faptul este posibil datorită prezenței unui mecanism activ al transportului ionic, care redistribuie ionii de sodiu și de potasiu pe cele două fețe ale membranei axonale în concentrații similare cu cele de dinaintea stimulării. La baza acestor schimburi ionice stau canalele de Na^+ și K^+ de pe membranele axonale. Studiile efectuate au stabilit că pe membranele axonilor nemielinici de mamifere, se află o densitate de canale de Na^+ de circa 100—200/μm^2, valoare apropiată de cea presupusă pentru a obține o viteză maximă de conducere a influxului nervos în fibra nemielinică. În cursul excitației se deschid canalele de sodiu care permit intrarea sodiului în fibră, iar repolarizarea este determinată de activarea

Scanned with OKEN Scanner

canalului de K^+. Aceasta presupune că porțile de Na^+ și K^+ sînt distribuite uniform pe lungimea membranelor axonilor amielinici, permițînd o propapagare continuă „în val" în lungul fibrei, a impulsului nervos. Propagarea valului de depolarizare în lungul axonului, pînă la terminația sinaptică, are drept consecință eliberarea neurotransmițătorului chimic în spațiul sinaptic (în cazul sinapsei chimice) sau propagarea fluxului ionic în receptorul sinaptic vecin, prin deschiderea canalelor de comunicare sinaptice (în cazul sinapse electrice).

În *fibrele nervoase mielinice*, schimbările locale se petrec numai la nivelul nodului Ranvier. La nivelul internodului, efectul izolator al mielinei previne propagarea continuă sub formă de val a impulsului. În consecință, impulsul sare de la un nod la altul. Această propagare *saltatorie* este mai rapidă decît cea continuă (fig. 9.31).

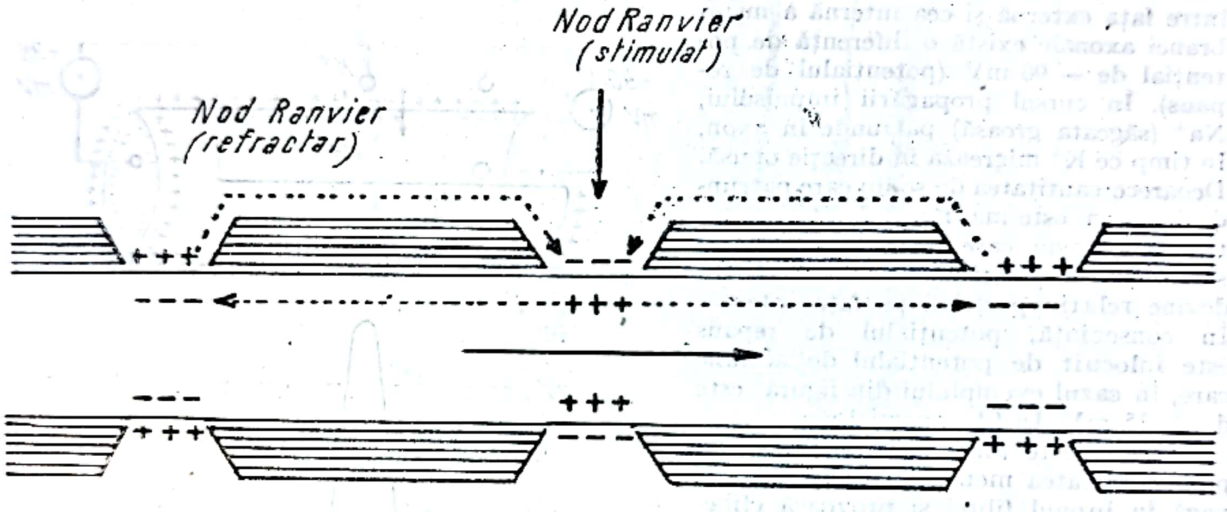


Fig. 9. 31. — Conducerea impulsului nervos într-o fibră mielinică: mișcarea ionului de Na^+ și K^+ are loc numai la nivelul nodurilor Ranvier. Deoarece mielina din segmentul internodal este un izolator electric bun, impulsul electric generat la nivelul unui nod, sare la nodul vecin. Acest tip de conducere a impulsului nervos este denumită saltatorie și se propagă foarte rapid. După stimulare, nodul Ranvier rămîne refractar o scurtă perioadă de timp. Din această cauză, deși cîmpul electric produs la nivelul unui anumit nod se răspîndește în ambele direcții (săgețile punctate), impulsul nervos fiziologic se deplasează într-o singură direcție (săgeata continuă din centrul fibrei).

Cercetări recente au stabilit că la baza propagării saltatorii a influxului nervos, în fibrele mielinice, se află un înalt grad de specializare regională a membranei axonale, în sensul segregării canalelor de Na^+ și K^+ în domenii complementare. Astfel în fibrele mielinice de mamifer, canalele de Na^+ prezintă o mare densitate la nivelul nodului Ranvier cel puțin $10(^3/\mu m^2)$ și o foarte mică densitate (prea mică pentru a sta la baza electrogenezei potențialului de acțiune) la nivelul membranei internodale, sub teaca de mielină.

De asemenea s-a dovedit că membranele axonilor mielinici prezintă o distribuție heterogenă spațială și în cazul canalelor de K^+. Canalele de K^+ ale axonilor mielinici de mamifere sînt repartizate complementar față de

canalele de Na^+. Canalele de K^+ sînt localizate în axolemă, sub teaca de mielină.

Un model privind segregarea canalelor de Na^+ și a celor de K^+ în fibrele mielinice de mamifere este prezentat în figura 9.32.

În consecință, diferențierea fibrei de mielină corespunde unei necesități funcționale particulare a acestui tip de fibre nervoase.

Deoarece permeabilitatea membranei se schimbă numai la nivelul nodului Ranvier dar nu și la nivelul internodal, sînt transportați mai puțini ioni în transmiterea saltatorie decît în cea continuă; în consecință, este cheltuită mai puțină energie în acest proces, deși fluxul nervos este mai rapid.

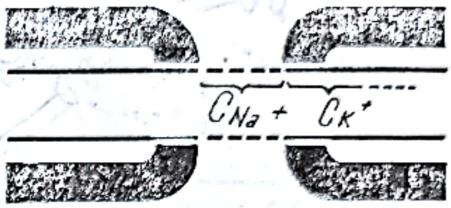


Fig. 9.32. — Localizarea canalelor ionice în fibra mielinică de mamifer: canalele de Na^+ *(CNa)* sînt localizate numai la nivelul nodului Ranvier iar canalele de K^+ *(CK)*, îndeosebi în zona paranodală și probabil și în cea internodală.

Energia folosită în conducerea impulsului este restabilită prin creșterea metabolismului în axon, ceea ce antrenează consumul de oxigen și producerea de căldură.

În funcție de proprietățile lor, fibrele nervoase se împart în trei categorii: A, B și C. Tipul de fibre A sînt mielinizate, au diametru mare, spații internodale lungi și conduc impulsul nervos rapid — 15—100 m/s. Tipul de fibre B au diametrul mai mic, internoduri mai scurte și o viteză de conducere mai mică — 3—14 m/s. Fibrele de tip C sînt subțiri, nemielinizate și transmit influxul nervos lent, cu o viteză de 0,5—2m/s.

9.5.2. NEUROTRANSMIȚĂTORII

Impulsul nervos este transmis de la un neuron la altul sau de la o celulă efectorie, prin *neurotransmițători* eliberați la nivelul sinapselor. Substanțele transmițătoare sînt stocate în veziculele sinaptice și eliberate de către impulsul nervos. Acestea traversează membrana presinaptică și se leagă de *receptori specifici* din membrana postsinaptică, ceea ce provoacă o creștere locală a permeabilității membranei pentru ioni. Această schimbare a permeabilității ionice a membranei postsinaptice se deplasează în lungul celulei nervoase, fiind responsabilă de propagarea influxului nervos în celula postsinaptică.

După ce și-a îndeplinit funcția, excesul de neurotransmițător, de exemplu *acetilcolina*, este hidrolizat prin acțiunea unei enzime denumită acetilcolinesterază. Întregul proces este foarte rapid și poate surveni într-o perioadă de timp foarte scurtă, de circa 1/100 dintr-o secundă (fig. 9.33).

Scanned with OKEN Scanner

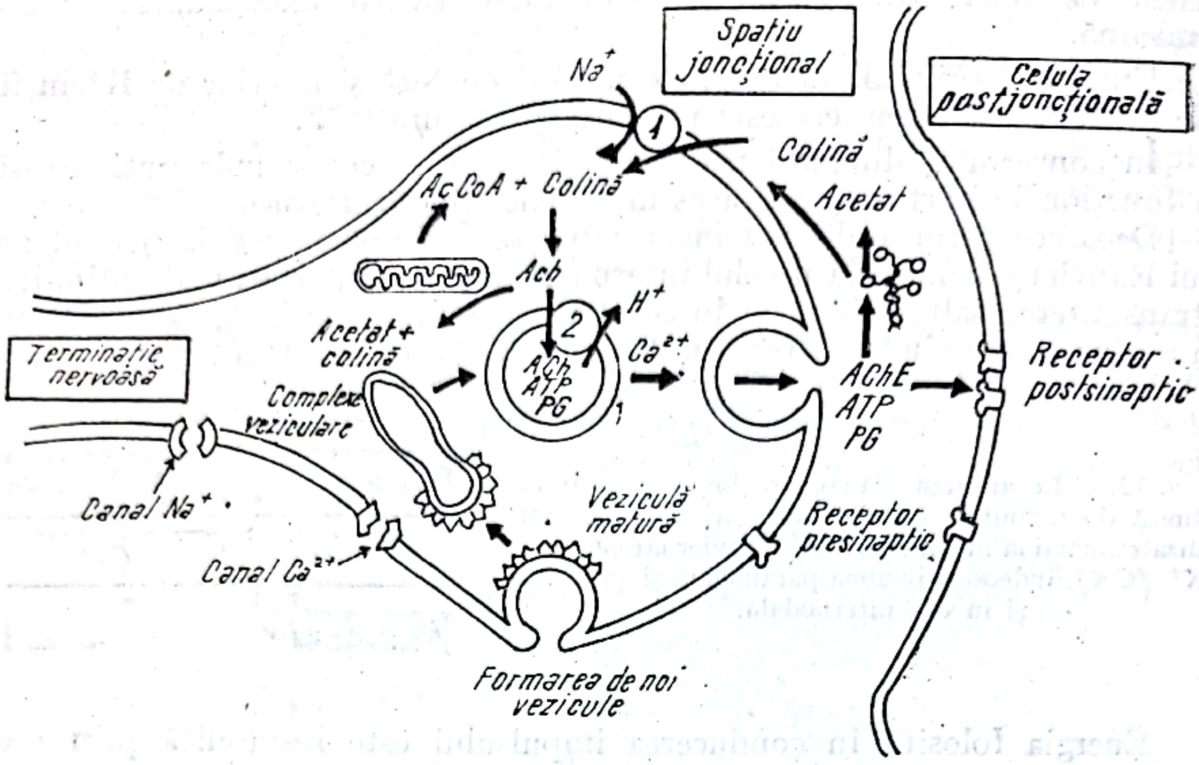


Fig. 9.33. — Schema joncțiunii colinergice: colina este recaptată și transportată în butonul presinaptic printr-un cărăuș (*1*) împreună cu ionul de sodiu, utilizînd gradientul de sodiu ca sursă de energie. Hemicolina poate inhiba acest transport. În interiorul butonului terminal colina se combină cu acetatul activat *(Ac CoA)*, printr-o reacție catalizată de colin-acetil-transferază, pentru a forma acetilcolina *(ACh)*. Formarea veziculelor de depozitare este inițiată prin depozitarea moleculelor de clatrină pe fața internă a membranei terminației nervoase (vezi partea de jos a figurii). După ce se detașează de la suprafață, se formează un complex vezicular de reticul endoplasmic *(RE)* care dă apoi naștere veziculelor de depozitare mature. ACh pătrund în veziculele de stocare printr-un transportor *(2)*, care utilizează ca sursă de energie fluxul extern al protonilor. În veziculele de depozitare mai sînt stocați ATP și proteoglicani *(PG)*. Eliberarea mediatorului chimic (ACh) survine atunci cînd un potențial de acțiune [transportat în lungul axonului, ca urmare a acțiunii canalelor de Na (sensibile la voltaj)] invadează terminația nervoasă. Potențialul de acțiune face să se deschidă canalele de calciu sensibile la voltaj (din membrana terminală presinaptică), ceea ce determină un influx de calciu. Creșterea calciului intracelular provoacă fuzionarea veziculelor cu membrana presinaptică, ceea ce produce exocitoza ACh, ATP și PG în spațiul sinaptic. Această etapă poate fi blocată de botulină. ACh este legată de receptorul postsinaptic transmițînd influxul nervos în fibra vecină. Acetilcolinesteraza (AChE) hidrolizează ACh în colină și acetat, care sînt reciclate.

Neurotransmițătorul din terminația postganglionară a sistemului simpatic este *norepinefrina*. Veziculele sinaptice care conțin norepinefrină sînt mai mari decît cele care conțin acetilcolină și de obicei au un miez electronodens, separat de membrană printr-o zonă clară (fig. 9.34).

În afară de acetilcolină și de norepinefrină există și alți neurotransmițători. Această funcție a fost demonstrată pentru *acidul gamma-aminobutiric* (GABA), *acidul glutamic*, *dopamina*, *serotonina* (5-hidroxitriptamina) și *glicina*.

La mamifere, GABA se află localizat exclusiv în sistemul nervos central. Există dovezi care sugerează că el acționează ca un inhibitor chimic al transmisiei nervoase.

Scanned with OKEN Scanner

Concepția actuală privitor la producția, eliberarea și inactivarea a doi mediatori chimici, cei mai bine cunoscuți, este rezumată în figurile 9.33 și 9.34.

În mod clasic, un neurotransmițător s-a considerat a fi o substanță eliberată la terminația presinaptică, care, după difuziunea prin spațiul simpatic, acționează asupra membranei postsinaptice. Activarea sa este localizată strict la regiunea sinaptică și durează cîteva milisecunde. Stoparea acțiunii este efectuată prin suprimarea transmițătorului fie prin degradarea enzimatică, fie pe calea mecanismului de receptare în terminația presinaptică.

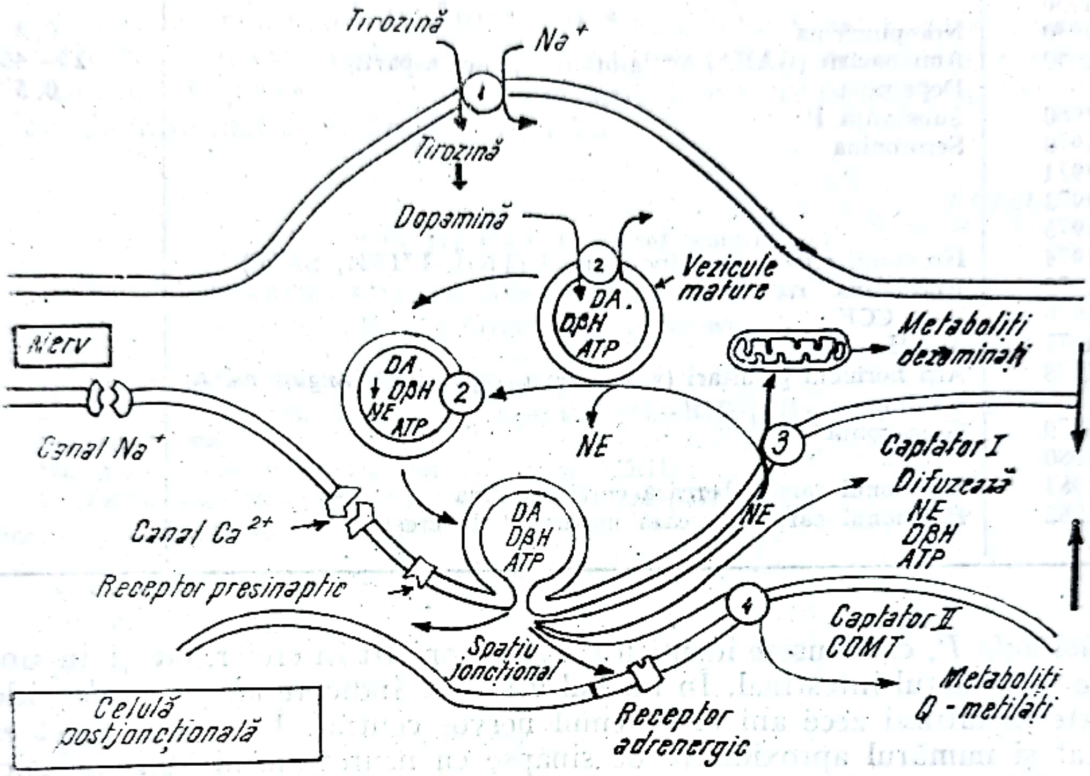


Fig. 9. 34. — Schema joncțiunii noradrenergice. Fibrele nervoase simpatice periferice prezintă varicozități pe traiectul lor, care formează joncțiuni sinaptice cu celulele efectorii. Tirozina pătrunde în varicozitatea noradrenergică printr-un transportor *(1)* care este legat de poarta de sodiu. În citoplasmă, tirozina este transformată în dopa prin decarboxilare și aceasta este hidroxilată pentru a forma dopamina *(DA)*. Dopamina pătrunde în veziculele de stocare printr-un mecanism de transport *(2)* care poate fi blocat de rezerpină. Același transportor poate stoca în vezicule norepinefrina *(NE)* sau alte amine biogene. Dopamina este transformată în norepinefrină prin intermediul dopamin-beta-hidroxilazei *(DBH)*. ATP este de asemenea prezent în mare concentrație în vezicule. Eliberarea mediatorului urmează apoi același mecanism ca și în cazul sinapsei colinergice. Odată ajunsă în spațiul intersinaptic, norepinefrina *(NE)* este fie legată de recepto r, fie receptată de transportor *(3)* (acesta poate fi blocat de cocaină sau de antidepresieele triciclice), fie captat de celula postjoncțională *(4)* pentru a fi remetilat.

Pînă recent, *monoaminele* (noradrenalina, epinefrina, dopamina și serotonina), *acetilcolina* și *aminoacizii* (ca glicina, glutamina și acidul gamma-aminobutiric) erau considerați singurii neurotransmițători care mediază comunicarea sinaptică și care corespund definiției de mai sus; ei sînt cunoscuți ca neurotransmițători *clasici*.

Neuropeptidele. Încă de prin anii '70 a fost caracterizată, din punct de vedere chimic și al activității sale biologice, o peptidă cunoscută sub numele

Cronologia identificării neurotransmițătorilor și neuropeptidelor. Procentul sinapselor din creier (după Snyder, **Science**, 1984, **224**, 22)

Anul	Transmițătorul	Procentul de sinapse în creier
1920	Acetilcolina	5—10
	Epinefrina	
1930		
1940	Norepinefrina	0,5
1950	Aminoacizii (GABA, ac. glutamic și ac. aspartic)	25—40
	Dopamina	0,5
1960	Substanța P	
1970	Serotonina	
1971		
1972		
1973		
1974	Hormonii eliberatori hipotalamici (TRH, LHRH, SRIF)	
1975	Encefalina	
1976	VIP, CCK	
1977	ACTH	
1978	Alți hormoni pituitari (vasopresina, oxitocina); angiotensina; insulina	
1979	Glucagonul	
1980		
1981	Hormonul care eliberează corticotropina	
1982	Hormonul care eliberează hormonul de creștere	

de *substanța P*, care fusese identificată anterior atît în creier, cît și în unele celule din tractul intestinal. În tabelul 9.I sînt indicate *alte peptide*, identificate în ultimii zece ani în sistemul nervos central. În același tabel este indicat și numărul aproximativ de sinapse cu neurotransmițători „clasici", prezenți în sistemul nervos central. Se poate observa că numai circa 40% din totalul sinapselor sistemului nervos central funcționează cu neurotransmițători de tip clasic. Este probabil ca *majoritatea sinapselor din creier* să fie cele al căror neurotransmițător este reprezentat de *peptide*. Există încă dispute asupra faptului dacă neuropeptidele pot fi considerate adevărați neurotransmițători sau dacă sînt numai neuromodulatori. Cea mai bună dovadă că peptidele identificate în creier acționează ca neurotransmițători convenționali a fost adusă de hormonul hipotalamic, care eliberează hormonul luteinizant hipofizar (LHRH = *luteinizing hormone releasing hormone*), prezent în ganglionul simpatic. S-a demonstrat că peptide similare cu LHRH sînt eliberate de acești ganglioni prin stimulare nervoasă (pe calea unui proces dependent de calciu) și că aceste peptide acționează direct asupra neuronilor simpatici, care răspund prin depolarizare după cîteva minute. S-a sugerat că LHRH funcționează ca transmițător provocînd un potențial excitator postsinaptic întîrziat, lent și persistent. Răspunsul la LHRH și potențialul excitator postsinaptic lent și întîrziat sînt însoțite de schimbări similare în conducerea prin membrană și în excitabilitatea neuronului; ambele sînt blocate de analogi ai LHRH care inhibă eliberarea de către LHRH a hormonului luteinizant.

Scanned with OKEN Scanner

Devine din ce în ce mai clar că noii transmițători (neuropeptidele) au o acțiune mai largă atît în privința duratei de acțiune cît și a distanței dintre locul de eliberare și țintă. Pentru a putea include și neuropetidele, prin neurotransmițători ar trebui înțelese acele substanțe care, fiind eliberate la nivelul terminațiilor presinaptice, pot produce modificări fiziologice în celula postsinaptică, similare celei obținute prin stimularea celulei presinaptice.

Concentrația neuropeptidelor din creier este cu cîteva ordine de mărime mai mică decît cea a neurotransmițătorilor clasici. Astfel, acetilcolina și monoaminele sînt prezente în creier în concentrație de 10^{-9}—10^{-10} moli/mg de proteină, iar aminoacizii — 10^{-6}—10^{-8} moli/mg. Concentrația cerebrală a majorității neuropeptidelor indicate în tabelul 9.II variază între 10^{-12} și 10^{-15} moli/mg de proteină. Această concentrație relativ scăzută nu trebuie să conducă la minimalizarea importanței lor.

TABELUL 9.II

Tipurile de peptide din creierul mamiferelor

Hormonii hipotalamici care eliberează hormonii hipofizari
(Hypothalamic releasing hormones)

- Hormonul care eliberează tirotropina (TRH)
- Hormonul care eliberează gonadotropina (FSH—RH) (LH—RH)
- Somatostatina
- Hormonul care eliberează corticotropina (CRH)
- Hormonul care eliberează hormonul de creștere (GH RH)

Hormonii neurohipofizari
- Vasopresina
- Oxitocina
- Neurofizina

Peptide pituitare
- Hormonul adrenocorticotropic (ACTH)
- Beta-endorfina
- Hormonul stimulator al melanocitelor
- Prolactina
- Hormonul luteinizant (LH)
- Hormonul de creștere (GH)
- Tirotropina

Peptide gastrointestinale
- Polipeptida vasoactivă intestinală (VIP)
- Colecistochinina (CCK)
- Substanța P
- Neurotensina
- Metionin-enkefalina
- Leucin-enkefalina
- Insulina
- Glucagonul
- Secretina
- Somatostatina
- TRH
- Motilina

Altele
- Angiotensina II
- Bradikinina
- Carnozina
- Peptidele somnului
- Calcitonina
- CGRP
- Neuropeptida Yy

Scanned with OKEN Scanner

Sinteza peptidelor cerebrale se face după același mecanism general descris pentru hormonii polipeptidici, ele derivînd din clivarea proteolitică post-traducere a unor molecule precursoare mai mari, cum este cazul moleculei precursoare *pro-opiomelanocortina* (POMC) (fig. 9.35).

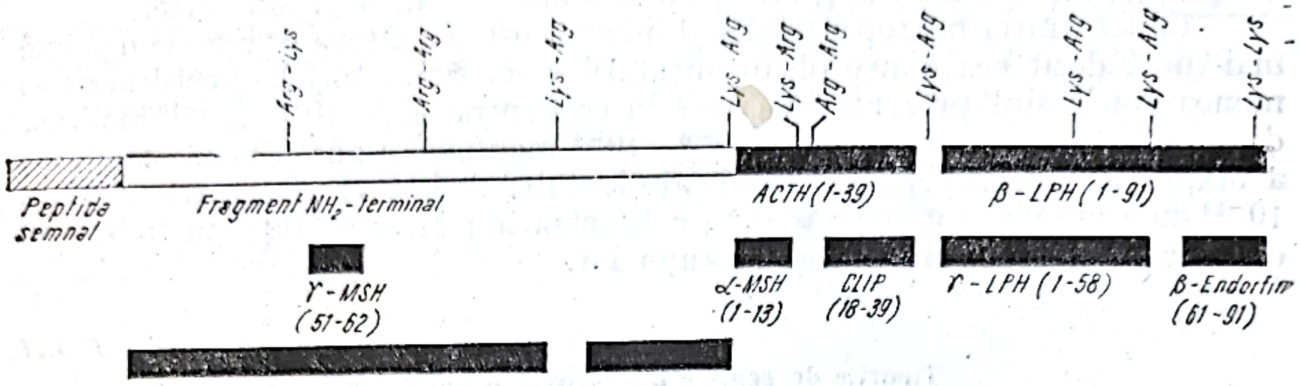


Fig. 9.35. — Reprezentarea schematică a moleculei precursoare de pro-opiomelanocortină. Punctul unde este indicată prezența aminoacizilor dibazici reprezintă locurile care pot fi rupte de către enzime similare tripsinei. Peptidele care pot rezulta ca urmare a acțiunii de clivare a unei enzime similare tripsinei, sînt desenate ca bare orizontale pe sau sub schema moleculei de pro-opiomelanocortină (vezi tabelul 9.II).

Nu este posibilă o descriere detaliată a *localizării neuropeptidelor* din creier. În figura 9.36 sînt prezentate schematic datele cunoscute, lăsînd însă loc unor considerații. Unele peptide, ca CCK și VIP, au cea mai mare concentrație în cortexul cerebral. Altele sînt prezente în cea mai mare concentrație în hipotalamus; acestea includ hormonii care eliberează hormoni, familia POMC, bombesina, neurotensina și angiotensina. Există, de asemenea, diferențe în conținutul peptidelor în raport cu diferitele regiuni ale neuronilor. În timp ce unele peptide sînt restrînse la corpul celulelor nervoase din anumite zone ale sistemului nervos, altele apar în corpul celulelor din mai multe zone și pe traiectul unui sistem de prelungiri scurte. Mai multe peptide pot fi găsite și în sistemul nervos periferic, ca substanța P, VIP, enkefalina, CCK și somatostatina, care sînt prezente în nervii vagi, splanhnici și ischiatici. În sfîrșit, s-a demonstrat coexistența neuropeptidelor și a neurotransmițătorilor clasici în aceiași neuroni.

Funcțiile neuropeptidelor. S-a constatat că peptidele cerebrale sînt implicate în diverse sisteme de comportament, durere, memorie, tulburări psihice, alimentație, temperatură, presiunea sanguină și altele.

A devenit evident că fiecare dintre aceste sisteme se află sub controlul mai multor neuropeptide, ca și al neurotransmițătorilor convenționali. Sînt în curs cercetări asupra rolului fiziologic și farmacologic al neuropeptidelor, atît la indivizii sănătoși cît și la cei cu diferite afecțiuni, pentru a oferi soluții terapeutice noi.

Cercetările asupra neuropeptidelor evidențiază adevărul subliniat de B. Scherrer (1978), că „celulele nervoase și celulele endocrine specializate în producția de hormoni polipeptidici nu sînt prea diferite".

Scanned with OKEN Scanner

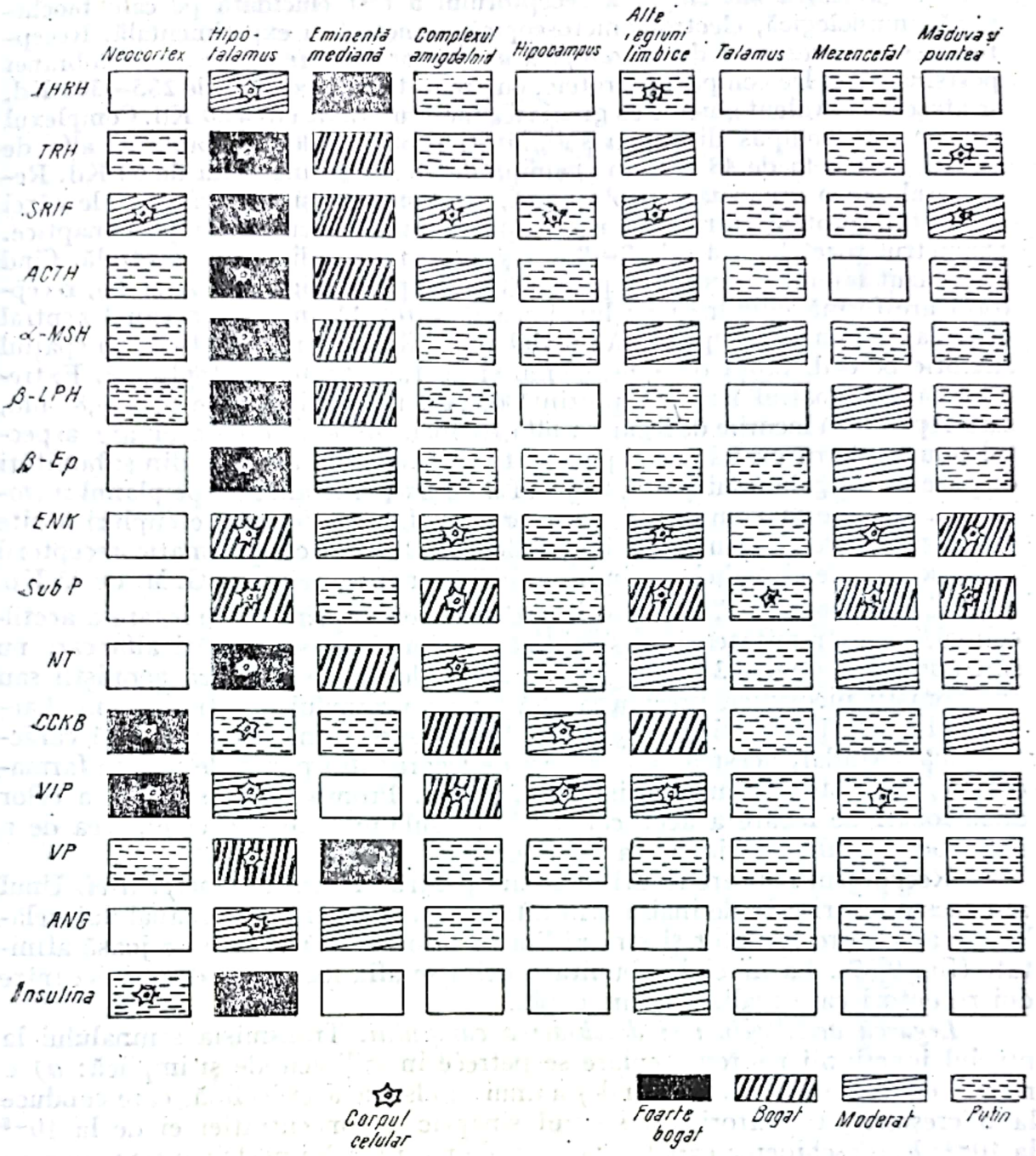


Fig. 9. 36. — Concentrația relativă a neuropeptidelor în diferite zone ale sistemului nervos (pentru prescurtări vezi tabelul 9.II).

9.5.3. RECEPTORUL PENTRU ACETILCOLINĂ

După cum s-a arătat, neurotransmițătorul emis de butonul presinaptic trebuie recunoscut de un *receptor* de pe membrana postsinaptică. Receptorul pentru acetilcolină este cel mai bine cunoscut receptor de neurotransmițător și, de asemenea, una din proteinele de membrane cel mai amplu investigată, cu proprietăți alosterice neîndoielnice.

Scanned with OKEN Scanner

Organizarea moleculară a receptorului a fost elucidată pe cale biochimică, imunologică, electronomicroscopică, genetică și experimentală. Receptorul este reprezentat de un *complex de glicoproteine integrale* ale membranei postsinaptice. De complexul proteic, cu greutatea moleculară de 285—303 Kd, se atașează covalent glucide cu greutatea moleculară de circa 20 Kd. Complexul proteic este compus din cinci subunități proteice, două subunități alfa de 39 Kd, una beta de 48 Kd, una gamma de 58 Kd și una delta de 64 Kd. Receptorul are o organizare neobișnuită, pentamerică și heterologă, ale cărei subunități proteice formează rozete pe suprafața membranei postsinaptice. Diametrul rozetelor este de 8—9 nm și prezintă o adîncitură centrală. Cînd este văzut lateral în secțiune, prin bistratul lipidic (fig. 9.37 A și B), receptorul are formă cilindrică cu lungimea de circa 11 nm, cu un canal central de circa 0,72 nm care reprezintă canalul ionic. Receptorul se extinde în spațiul sinaptic pe o distanță de 4,5—5,5 nm și de 1,5—2 nm în citoplasmă. Extremitatea din spațiul sinaptic prezintă două densificări de cîte 0,7—0,8 nm, care reprezintă locurile de legare a alfa-toxinei. Astfel, receptorul are aspectul unui cilindru proteic cu o polaritate transversală, alcătuit din subunități dispuse ca doagele unui butoi, în jurul unui ax perpendicular pe planul membranei. De cele mai multe ori receptorii se află sub formă de cupluri a cîte doi, legați între ei prin punți bisulfidice. Pe frontul citoplasmatic receptorii sînt ancorați de citoschelet prin intermediul unor proteine cu G. M. de 43 Kd.

Unele proprietăți. Receptorul are două locuri primare de legare a acetilcolinei, pe extremitatea intersinaptică a celor două subunități alfa care nu sînt adiacente (fig. 9.37 B și C). De aceste locuri se atașează agoniștii sau antagoniștii nicotinici, precum și alfa-toxina veninului de șarpe, în mod reversibil sau prin substituția reciprocă într-o succesiune farmacologică caracteristică. Așadar, acestea sînt „locuri de legare" din punct de vedere farmacologic, agoniste sau antagoniste, *competitive*. Proprietatea esențială a celor două locuri de legare a acetilcolinei de pe subunitățile alfa este aceea de a regla permeabilitatea ionică a receptorului.

Receptorul mai are locuri de legare pentru blocanții *necompetitivi*. Unul din aceste locuri este de înaltă afinitate și se află în interiorul canalului, celălalt se află între receptor și stratul lipidic înconjurător și este de joasă afinitate (fig. 9.37). La nivelul subunității delta se află legăturile disulfidice între doi receptori care realizează un cuplu.

Legarea acetilcolinei și deschiderea canalului. Transmisia semnalului la nivelul joncțiunii neuromusculare se petrece în milisecunde și implică: *a)* o rapidă eliberare (în microsecunde) a unui „puls" de acetilcolină, care conduce la o creștere tranzitorie în spațiul sinaptic a concentrației ei de la 10^{-5} la 10^{-4}; *b)* deschiderea canalelor ionice ale receptorului postsinaptic prin care se scurg 10^6—10^7 ioni/secundă/canal deschis și are ca efect depolarizarea membranei postsinaptice. Deschiderea canalului este urmarea acțiunii cooperate a două molecule de acetilcolină asupra celor două locuri de legare de pe subunitatea alfa, care are drept consecință modificarea conformației subunităților proteice ale receptorului; *c)* hidroliza rapidă a acetilcolinei de către acetilcolinesteraza membranei postsinaptice.

Repartiția receptorilor în membrană. Distribuția receptorilor de acetilcolină în joncțiunile neuromusculare la adult este restrînsă la membrana postsinaptică, care se află sub terminația nervoasă. În aceste regiuni densitatea receptorilor poate ajunge la 15 000—20 000 pe micronul pătrat, iar raportul

Scanned with OKEN Scanner

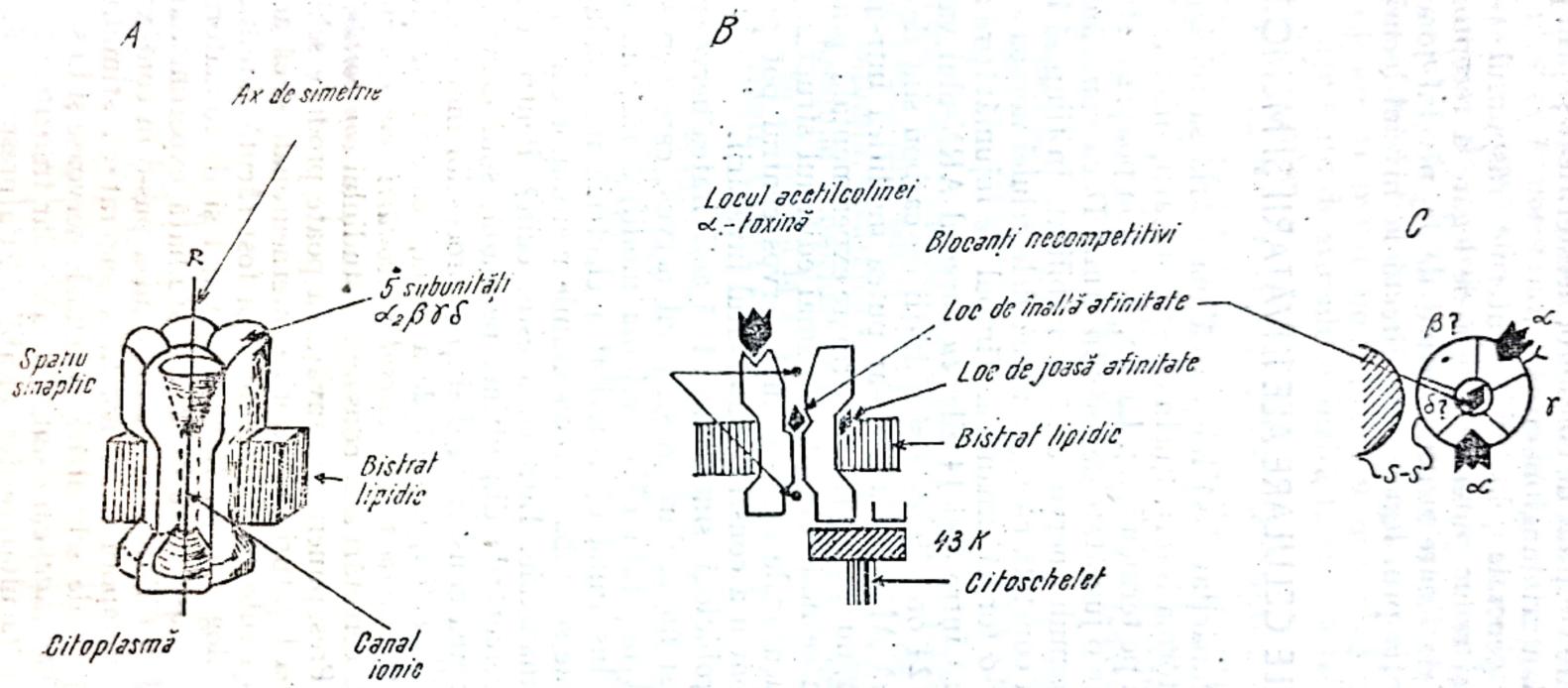


Fig. 9. 37.

A — schema în spațiu a unui receptor colinergic pentameric văzută lateral; *B* — schema repartiției locurilor de legare a liganzilor farmacologic activi; în *centru* — vedere laterală în secțiune a pentamerului; *C* — în *dreapta* — vedere frontală a unui pentamer și a legăturii sale cu pentamerul alăturat.

Scanned with OKEN Scanner

lipid/proteine în această regiune de membrană este net în favoarea proteinelor (0,4—0,5). Componenta lipidică a membranei postsinaptice este caracterizată printr-un mare conținut de colesterol neesterificat și prin predominanța acizilor grași cu lanțuri lungi nesaturate.

Anestezicele generale blochează puternic răspunsul permeabilității ionice la agoniști și reduc puternic viteza de legare a receptorilor, fie prin blocarea locurilor de legare necompetitive de la nivelul joncțiunii dintre lipide și receptori, fie prin legarea lor directă la nivelul locurilor de înaltă afinitate.

9.5.4. BAZELE CELULARE ALE ÎNVĂȚĂRII ȘI MEMORIZĂRII

Creierul are capacitatea să folosească mașinăria sa celulară și moleculară pentru a transforma informația în vederea stocării, sub formă de memorie pe termen scurt sau pe termen lung. La om, memoria poate să stocheze informații culese cu peste o jumătate de secol în urmă. Dacă vom căuta moleculele componente ale sistemului nervos a căror stabilitate în timp să îndeplinească acest criteriu, vom constata că toate moleculele celulei nervoase, cu excepția ADN-ului, sînt într-o formă dinamică. Timpul de înjumătățire a proteinelor neuronale se situează între 6 și 14 zile; *turnover*-ul ARN-ului variază între o jumătate de oră și 24 ore; lipidele și hidrații de carbon sînt de asemenea în flux rapid. Ideea că ADN-ul însuși s-ar putea modifica într-un fel pentru a codifica învățarea, nu și-a găsit o confirmare experimentală pînă în prezent.

Este din ce în ce mai evident că numai edificiul structural și sistemul de conexiuni interneuronale din sistemul nervos central pot prezenta suficientă stabilitate pentru a constitui substratul învățării.

Numeroși neurobiologi sînt de acord că activitatea nervoasă determină imbări celulare și moleculare în sistemul nervos, care persistă în timp. Observația generală ne arată că experiența modifică răspunsurile comportamentale. Aceasta înseamnă că activitatea electrică neuronală trebuie într-un fel să determine schimbări în conexiunile neuronilor care mediază diferite stări comportamanetale. Întrebarea este: cum? Pentru a răspunde la această întrebare, cercetările din ultima perioadă, s-au dezvoltat pe două căi aparent diferite: una consacrată deslușirii proceselor moleculare care stau la baza *plasticității sinaptice*, iar cea de a doua, care vizează identificarea *schimbării conexiunilor nervoase în cursul dezvoltării embrionare*.

Primul grup de cercetări sînt consacrate studiului *comportării sinapselor la animalele adulte*. Presupunerea că învățarea poate produce schimbări prelungite în eficacitatea legăturilor sinaptice interneuronale și că aceste schimbări ar putea servi ca substrat al memoriei, a fost făcută simultan, încă din 1894, de marele histolog spaniol Ramon Y Cajal și de fondatorul psihanalizei, S. Freud. Dar această idee nu a fost studiată experimental pînă cînd psihologul polonez Jerzy Konorski, în 1948, nu a pus-o în contextul neurofiziologiei celulare contemporane. Konorski a sugerat că stimulii senzoriali pot produce două tipuri de schimbări în celulele nervoase și în sinapsele lor: *a) schimbări de excitabilitate*, care sînt constante dar tranzitorii; și *b) schimbări plastice*, care sînt facultative dar durabile. El a presupus că, combinații adecvate de stimuli produc tipul constant de schimbări ale excitabilității, însă, de asemenea, pot da naștere și la schimbări plastice care produc *transformări funcționale permanente* într-un sistem de neuroni.

Scanned with OKEN Scanner

În ultimii 20 de ani s-au făcut progrese remarcabile în fundamentarea științiică a *plasticității sinaptice.*

Mai întîi s-au descris patru tipuri de modulații sinaptice: două tipuri de schimbări plastice *homosinaptice* (schimbările interesează activitatea neuronilor presinaptici) și două tipuri de schimbări plastice *heterosinaptice* (schimbările au loc în activitatea neuronilor asociați care converg asupra sinapsei respective). Primul tip de plasticitate homosinaptică descoperit a fost denumit *de potențare posttetanică.* S-a dovedit că potențialul sinaptic (la nivelul anumitor sinapse) poate fi mărit de la cîteva minute pînă la cîteva ore, ca urmare a unei scurte suite de stimuli de înaltă frecvență (stimul tetanic), aplicați la nivelul butonilor presinaptici.

Cel de al doilea tip de plasticitate homosinaptică este *depresiunea de joasă frecvență,* prin care o perioadă de activitate scăzută produce o depresiune în eficacitatea transmisiei sinaptice. Ambele forme sînt homosinapse.

Cel de al treilea tip de plasticitate sinaptică descoperit a fost *inhibiția heterosinaptică,* adică suprimarea activității unei căi nervoase prin potențialul sinaptic al altei căi.

Cel de al patrulea tip de plasticitate sinaptică a fost denumit *facilitarea heterosinaptică;* datorită acesteia, activitatea unei căi antrenează activarea alteia.

Analiza unor forme simple de învățare la nevertebrate indică faptul că schimbările în persistența sinapselor sînt responsabile de stocarea sub formă de învățare. *Habituația,* învățarea să ignore stimuli repetați, constituie o formă specială de depresiune homosinaptică. Spre deosebire de aceasta, *sensibilizarea,* învățarea să răspundă la stimuli în mod obișnuit neutri, ca urmare a acțiunii concomitente a unui stimul nociv, este o formă de facilitare presinaptică.

Kandel și colaboratorii au stabilit mai întîi importanța mecanismelor moleculare ale schimbului calciului la nivelul sinapselor pentru plasticitatea acestora și, implicit, pentru diferite forme de învățare. Recent, ei au propus un mecanism molecular bazat pe rolul canalelor complexe ionice și pe fosforilarea proteinelor dependente de AMP-ciclic, pentru a explica modularea sinaptică.

În sfîrșit, V. Shashoua aduce dovezi experimentale că sinteza unei proteine cerebrale, denumită *ependimină,* joacă un rol important în învățare, contribuind, sub controlul calciului, la dezvoltarea sinapselor plastice (fig. 9.38).

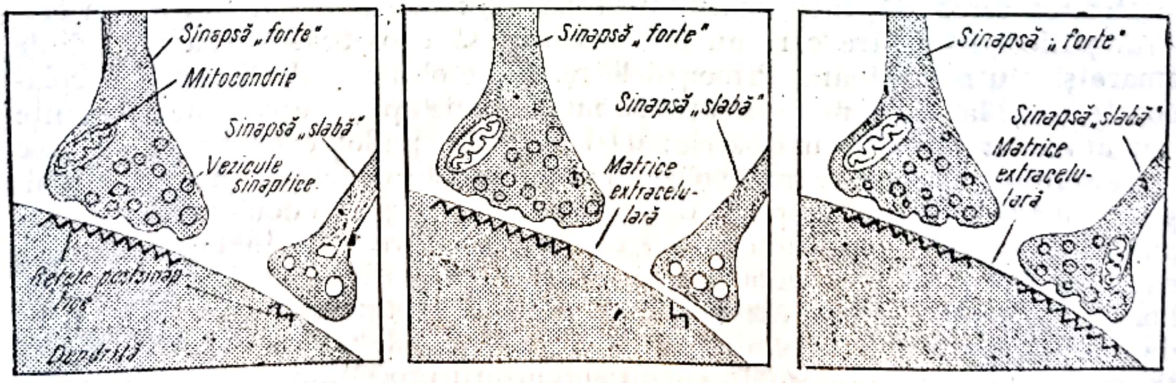


Fig. 9. 38. — Schema rolului posibil jucat de ependimină în transformarea sinapselor slabe în sinapse forte, în cursul procesului de învățare.

Scanned with OKEN Scanner

Un domeniu foarte diferit de cel expus mai înainte, pentru explorarea capacității *activității nervoase* de a induce schimbări care să persiste un timp îndelungat, ne este oferit de studiul *dezvoltării sistemului nervos*. Dovezi că activitatea influențează stabilirea conexiunilor în dezvoltarea creierului, ne sînt oferite de experiențele asupra dezvoltării vederii la animale. Dacă este aplicat, de pildă, un bandaj pe un ochi al unui animal tînăr (pisică sau maimuță nou-născută), impulsurile recepționate de scoarța vizuală segregă treptat-treptat, iar cu timpul fasciculele de fibre care vin de la ochiul acoperit (chiar numai alternativ) sînt scoase din funcție; de asemenea, coloana de fibre nervoase care pornesc de la ochiul acoperit se îngustează; în sfîrșit, proporția neuronilor din scoarță asupra cărora acționează ochiul căruia i s-a aplicat obstacolul, scade semnificativ. Aceste observații lasă puține îndoieli că numeroase conexiuni inițiale dintre neuronii centrali și impulsurile lor pot fi stimulate sau suprimate sub influența activității.

Mai mult, contrar dogmei statornicite de mult timp, experiențele recente arată că *neuronii pot să-și schimbe în mod esențial tipul de transmițător*, atît pe parcursul dezvoltării, cît și la maturitate. De exemplu, neuronii simpatici, considerați în mod clasic ca exclusiv noradrenergici sau colinergici, pot de asemenea să elaboreze peptide neurotransmițătoare ca substanța P sau alte neuropeptide. Această *plasticitate neuronală* este legată direct de depolarizarea neuronală și de influxul de sodiu. Aceste mecanisme moleculare și răspunsuri plastice se întîlnesc atît la neuronii maturi cît și la cei în curs de dezvoltare. Dar nu numai atît, contrar celor învățate în mod tradițional, neuronii senzoriali primari de la adult pot să exprime fenotipul catecolaminergic *in vivo*. Plasticitatea transmițătorilor nu se restrînge numai la sistemul nervos periferic. Studiile în curs de dezvoltare, efectuate pe neuronii cultivați *in vitro* din nucleul *locus coeruleus*, arată că factori extracelulari specifici determină îm mod selectiv schimbarea sintezei transmițătorului. În consecință, tipul de transmițător elaborat, ca și metabolismul, sînt procese dinamice, care pot fi modificate, fiind reglate de o varietate de factori. *Plasticitatea transmițătorilor adaugă o nouă dimensiune flexibilității funcției sistemului nervos.*

În sfîrșit, profesorul S. Rose din Anglia a întreprins în ultimii ani cercetări care urmăresc exploatarea avantajelor ambelor linii de explorare a mecanismelor memorizării menționate mai sus. În esență, el a adus contribuții însemnate la înțelegerea bazelor celulare ale memorizării investigînd localizarea cerebrală, modificările neuronale și moleculare care au loc în creierul puilor de pasăre care au fost învățați să deosebească apa de lichide amare și rău mirositoare. Principalele rezultate obținute de S. Rose și colaboratorii săi la puii care au învățat să nu consume apă care conține substanțe rău mirositoare sînt următoarele: *a)* în creierul puilor care învață are loc o creștere foarte mare a metabolismului glucozei în neuronii din trei regiuni, și anume în regiunea corespunzătoare cortexului stîng și în două regiuni corespunzătoare asociațiilor motorii; *b)* cantitatea de vezicule în butonii presinaptici colinergici crește cu 60% prin procesul învățării; *c)* modificările metabolice și sinaptice sînt tranzitorii dacă procesul învățării durează mai puțin de o oră și devine de lungă durată dacă exercițiile de învățare sînt efectuate timp de mai multe ore; *d)* în cursul stabilizării procesului de învățare (deci prin memorizare) se sintetizează glicoproteine sinaptice specifice iar frecvența transmiterii influxului sinaptic crește de peste patru ori față de martori.

Scanned with OKEN Scanner

Prin aceste cercetări autorii au dovedit că modificările cerebrale, celulare, metabolice, în sinteza glicoproteinelor și cele electrofiziologice, sînt *necesare* și *specifice* în procesul de învățare și memorizare. Trebuie precizat că ele *nu* sînt și *suficiente* și că este foarte probabil că și alte procese sînt implicate în memorizare. Experiențele menționate sînt o aplicație a strategiei reducționiste în cercetarea memoriei. Nu se poate pretinde că memoria — chiar și cea atît de simplă a puilor de pasăre — poate fi redusă la molecule. Este foarte probabil că memoria nu rezidă numai în schimbări moleculare, ci, într-un anumit sens, ea constă în reorganizarea și complexarea relațiilor celulare pe care aceste molecule le provoacă.

9.5.5. BAZELE CELULARE ALE DEZVOLTĂRII ȚESUTULUI NERVOS

Creierul uman crește în greutate de 5 ori de la naștere pînă la vîrsta de 20 de ani, creștere extrem de rapidă în primii trei ani de viață. La 6 luni creierul copilului ajunge la jumătate din greutatea creierului adultului; la un an atinge 2/3, la trei ani 80%, la 6 ani 90%, prentru ca la pubertate să reprezinte 95%. Electroencefalograma diferă de asemenea de la o vîrstă la alta, apropiindu-se treptat de tipul adult, care nu se exprimă decît după pubertate.

Se știe că la naștere creierul copilului conține deja toți neuronii de care are nevoie creierul adultului. În acest caz se naște întrebarea cum se explică spectaculoasa creștere a creierului după naștere?

Creșterea sistemului nervos se datorează în primul rînd faptului că la naștere imensa majoritate a neuronilor săi nu sînt funcționali; ei apar ca neuroni embrionari mici, nediferențiați, sub formă de *neuroblaști*. Neuroblaștii sînt celule mici, provenite din celulele neuroepiteliale precursoare ale tubului neural primitiv care au parcurs doar primele faze proliferative ale histogenezei, și anume cele două valuri de mitoze succesive de proliferare și de diferențiere. Datorită acestui fapt, neuroblaștii se mai numesc și celule *postmitotice*. Pentru a deveni neuroni funcționali maturi, neuroblaștii sau celulele postmitotice mai au de parcurs încă trei faze, și anume: *A) faza de migrare* la locul pe care-l vor ocupa în stadiul final (uneori, cum este cazul scoarței cerebeloase, migrarea se desfășoară în două etape, și anume: *a)* din peretele tubului neural la suprafață, unde are loc un al doilea proces proliferativ de prediferențiere și *b)* de la suprafață la locul definitiv, unde se petrece etapa următoare), *B) faza de diferențiere* și *C) faza de maturare*. Parcurgerea fazelor neurogenezei este un proces extrem de complex, la care concură atît factori genetici cît și epigenetici (cum sînt cei din mediul extracelular). Oricum, pentru imensa majoritate a neuroblaștilor, faza de migrare și îndeosebi cea de diferențiere, au loc după nașterea copilului, în cursul creșterii sistemului nervos pînă la atingerea stadiului adult. În cursul diferențierii, celulele nervoase vor crește treptat-treptat, se vor ramifica și vor stabili conexiuni (sinapse) între ele.

Începînd din luna a 18-a, cea de a doua categorie de celule ale țesutului nervos, celulele nevroglice precursoare, se vor angaja într-un proces de proliferare cu ritm rapid, astfel încît la adult, ele vor fi de 10 ori mai numeroase decît neuronii. Înmulțirea celulelor nevroglice are loc în strînsă corelație cu diferențierea neuronilor și are drept consecință constituirea treptată, din prima copi-

Scanned with OKEN Scanner

lărie pînă la faza adultă, a diferitelor *căi nervoase* care reprezintă substratul principal al creşterii postnatale a sistemului nervos.

Diferenţierea neuronilor, proliferarea şi diferenţierea nevrogliilor, ca şi constituirea căilor nervoase în cursul creşterii postnatale a sistemului nervos, se exprimă prin ample bulversări ale diferitelor segmente nervoase.

Una din descoperirile făcute în ultimii ani este stabilirea faptului că, creşterea neuronilor se face cu preţul unor ample fenomene de regresiune şi distrugere. Factorii care controlează creşterea neuronilor sînt încă puţin cunoscuţi, dar un lucru este cert, şi anume că această creştere nu se desfăşoară linear. Creşterea trunchiurilor axonale, multiplicarea rădăcinilor dendritice, stabilirea de noi conexiuni (sinapse) interneuronale, se însoţesc de distrugeri de ramuri axonale, de spini dendritici, de sinapse şi chiar, cel puţin la începutul vieţii, de populaţii întregi de neuroni. Cu alte cuvinte, se distruge pentru a se construi definitiv.

De fapt, nou-născutul însuşi a pierdut deja o parte din contingentul său iniţial de neuroni. Ca şi la alte mamifere, o categorie întreagă de neuroni ai stratului extern al cortexului a dispărut deja la naştere. Desigur, ţinînd seama de numărul enorm de neuroni (circa 150 000/mm² de suprafaţă corticală) este foarte dificil să se sesizeze pe o secţiune histologică de cîteva miimi de milimetru, moartea uneia sau a cîtorva celule nervoase. Totuşi, s-a putut demonstra că 40 % din neuronii motori ai măduvei spinării, dispar în perioada dintre a 5-a zi a dezvoltării embrionului puiului de găină pînă în faza adultă. Transformarea mormolocului în broască se face cu dispariţia unei familii mari de neuroni din măduva spinării.

Această „hecatombă" neuronală este întovărăşită de dispariţia unui mare număr de ramuri axonale, dendritice şi de sinapse. La un pui de şobolan, de exemplu, fiecare fibră musculară este controlată de patru sau cinci terminaţii nervoase motorii; or acestea dispar una după alta cînd şobolanul învaţă să meargă şi la adult nu mai rămîne decît o terminaţie nervoasă pentru fiecare fibră musculară. De asemenea, în cerebelul şobolanului nou-născut, fiecare celulă Purkinje primeşte impulsul de la trei sau patru neuroni diferiţi, pentru ca la vîrsta adultă, fiecare celulă Purkinje să nu primească instrucţiuni decît prin fibrele agăţătoare trimise de o singură celulă. În cortexul de maimuţă (macac) spinii care acoperă dendritele celulelor piramidale din scoarţa cerebrală ating numărul maxim la 8 săptămîni după naştere, apoi se reduc la jumătate pe parcursul restului perioadei de creştere. Numărul ramurilor axonale colaterale ale celulelor piramidale se reduce de asemenea considerabil în cursul dezvoltării.

Imposibilitatea de a experimenta pe om nu a împiedicat analiza comparativă a creierului de copil şi a celui de adult. Ca urmare, se ştie că familii întregi de neuroni au dispărut la naşterea copilului. De asemenea, cu aproximativ un secol în urmă, neuroanatomistul Ramon Y Cajal a constatat că la copil axonii celulelor Purkinje posedă 20—40 de ramificaţii colaterale, pentru ca la adult să nu mai rămînă decît 4—5. Mai recent, s-a constatat că organizarea creierului nu este identică la stîngaci şi la dreptaci. În mod special corpul calos care leagă cele două emisfere este cu 10% mai dezvoltat la stîngaci. Explicaţia actuală nu este aceea că la stîngaci corpul calos a crescut mai mult decît la preptaci, ci, dimpotrivă, că la aceştia din urmă au dispărut fibre nervoase pe care stîngacii le-au conservat.

Scanned with OKEN Scanner

Conchizînd, trebuie reținut că la baza creșterii postnatale a sistemului nervos stă diferențierea neuronilor, înmulțirea celulelor nevroglice și formarea căilor nervoase. De asemenea, atît în cursul dezvoltării cît și în perioada adultă sau la senescență, în sistemul nervos se petrec permanente schimbări tisulare.

Una din problemele majore ale neurobiologiei moderne este aceea de a elucida mecanismele care conduc la constituirea cu precizie a căilor nervoase în cursul dezvoltării sistemului nervos, precum și modul în care neuronii se recunosc unii pe alții și stabilesc legături sinaptice corespunzătoare.

În prezent, nu dispunem de o concepție generală unitară asupra diferențierii celulelor nervoase. În ultimii ani s-au acumulat însă numeroase fapte experimentale care, deși nu procură o viziune coerentă de ansamblu asupra neurogenezei, au dus la clarificarea unor aspecte importante ale problemei ce se constituie într-o bază pentru progrese în continuare rapide, teoretice și practice, în acest domeniu.

Vom prezenta pe rînd unele din progresele din domeniul neurogenezei, cu referire specială asupra factorilor intra- și extracelulari; alte aspecte ale acestei probleme sînt abordate în paragrafele precedente — de exemplu, remodelarea proteinelor de suprafață este abordată la citoschelet, mielinogeneza la fibrele nervoase, modelarea sinaptică la sinapsă etc.

9.5.5.1. Encefalinele și dezvoltarea țesutului nervos

Sistemul opioid endogen a fost implicat într-o mare varietate de funcții, inclusiv în reglarea dezvoltării sistemului nervos. În sistemul nervos aflat pe cale de dezvoltare a fost detectată cea mai mare cantitate de endorfine tisulare precum și de receptori pentru substanțe opiacee. Administrarea la animalele pe cale de dezvoltare a antagonistelor opioide în doze care produc blocarea continuă sau intermitentă a interacțiunii endorfinelor cu receptorii opioizi, provoacă o puternică alterare a dezvoltării somatice și nervoase a animalelor respective.

Substanțele encefalinice au fost detectate în celulele nervoase de la feți și de la animalele nou-născute. Cerebelul de șobolan nou-născut constituie un material de preferat pentru studiul relației dintre endorfine și dezvoltarea celulelor nervoase. Se știe că neuronii scoarței cerebeloase, inclusiv neuronii Purkinje (stratul intermediar), precum și neuronii stratului granular intern, provin dintr-un strat de celule germinative externe care, după ce se înmulțesc (în cea de a doua etapă mitotică), migrează de la suprafață în stratul de destinație (stratul Purkinje sau granular) și se diferențiază odată ce ajung în locul final. Migrarea celulelor nervoase este ghidată de către celulele nevroglice. Întreg acest proces are loc în primele trei săptămîni de la naștere. Activitatea proliferativă atinge punctul maxim între zilele a 6-a și a 10-a, după care se accentuează migrarea, urmată de diferențiere. Cercetările de citochimie dovedesc că metionin-encefalinele și leucin-encefalinele sînt concentrate în stratul germinal din celulele proliferative matriceale. Reacția se limitează la citoplasmă și nu este prezentă și în nucleu. Encefalinele nu au fost detectate în celulele diferențiate ca celule Purkinje sau celulele stratului granular. Aceste cercetări dovedesc că opioidele endogene sînt în mod specific implicate în primele faze ale dezvoltării sistemului nervos, în mod special în faza de proliferare și nu și în cea de migrare sau în cea de diferențiere terminală.

Scanned with OKEN Scanner

9.5.5.2. Moleculele adezivității celulelor nervoase

Stabilirea conexiunilor neuronale în timpul embriogenezei depinde de o diversitate de procese de recunoaștere celulară care includ interacțiuni celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară. Adezivitatea celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară a fost bine studiată îndeosebi în cursul dezvoltării sistemului nervos și mai multe macromolecule care joacă un rol important în aceste interacțiuni au fost identificate și caracterizate, ele fiind cunoscute sub indicativul de CAM *(cell adhesion molecule)*.

Moleculele adezivității cel mai bine caracterizate sînt cele cunoscute sub inițialele de *N-CAM* (de la *the neurall cell adhesion molecule)* care mediază procesele de adezivitate via un mecanism de legare homofilic, adică N-CAM de pe o celulă se leagă de N-CAM de pe alta. N-CAM împreună cu L-CAM și uvomorulina mai sînt desemnate și drept CAM-uri *primare*, deoarece ale apar încă în primele faze ale embriogenezei (în fazele de morulă, gastrulă și neurulă). S-a dovedit că N-CAM sînt identice cu moleculele denumite de alți autori moleculele D_2 (sau D_2CAM), precum și cu proteina-2 a suprafeței creierului (BSP-2). S-a sugerat că N-CAM joacă un rol important în organizarea traiectelor nervoase prin controlul interacțiunii neuron-neuron, neuron-nevroglie, neuron-miocit. Anticorpii anti-N-CAM au acțiune inhibitorie, cînd sînt adăugați *in vitro*, asupra agregării celulelor neuronale, dezvoltării histotipurilor în agregatele celulare în culturi, precum și asupra explantelor retiniene sau interacțiunii nervilor și a celulelor musculare. Așa de exemplu, adăugarea anticorpilor anti-N-CAM în culturile *in vitro* din ganglionii spinali provoacă disocierea neuriților și blochează asocierea lor în fascicule. În plus, anticorpii anti-N-CAM blochează acțiunea de ghidare *in vivo* a axonilor nervului optic, exercitată de prelungirile celulelor neuroepiteliale. De asemenea, inițierea stabilirii de contacte între neuriți și mușchi depinde de acțiunea adezivă exercitată de N-CAM.

În *totalul N-CAM* izolat din creierul rozătoarelor au fost identificate trei tipuri distincte de glicoproteine: *forma A* a cărei greutate moleculară variază între 180 000 și 250 000 daltoni, *forma B* între 135 000 și 140 000 daltoni și *forma C* între 115 000 și 120 000 daltoni.

Studiul asupra compoziției subunităților moleculelor de N-CAM a condus la concluzia că domeniul lor *extracelular* (bogat glicozilat și sulfatat) este alcătuit din capătul amino-terminal al lanțului polipeptidic de care este legat fragmentul glucidic care cuprinde reziduuri din acid sialic (atașat de un fragment proteolitic) și locusurile de legare (capabile să se ancoreze de molecule similare de pe alte celule). Capătul amino-terminal al polipeptidei cuprinde o secvență de aminoacizi identică în toate cele trei forme de N-CAM, restul lanțului polipeptidic fiind asemănător. Cele trei tipuri de glicoproteine (A, B și C) diferă în privința lungimii capătului terminal carboxilic al lanțului polipeptidic, adică în privința domeniului hidrofob din bistratul lipidic și a domeniului endocelular. Caracteristicile domeniului extracelular enumerate conferă unele proprietăți imunobiologice similare celor trei forme de N-CAM.

Se presupune că cele trei lanțuri polipeptidice (de la capătul lor amino-terminal extern pînă la capătul carboxilic intern) sînt identice atît în forma adultă cît și în cea embrionară. Forma embrionară a moleculelor de N-CAM diferă însă substanțial de cea adultă, datorită conținutului său foarte mare în acid sialic, într-o formă polimerică neobișnuită. În comparație cu forma

Scanned with OKEN Scanner

embrionară, forma adultă conține numai o treime de acid sialic și este mai puternic adezivă.

A fost studiată *biosinteza* moleculelor adezivității celulelor nervoase (N-CAM) în *culturile primare* de neuroni granulari cerebeloși, de celule gliale și de celule musculare. Cu acest prilej, s-a constatat că cele trei tipuri de celule produc tipuri diferite de glicoproteine N-CAM. Celulele gliale sintetizează glicoproteine de 135 000 d, adică forma B și forma C (de 115 000 d); celula nervoasă sintetizează glicoproteina A (200 000 d) și forma B (135 000 d); celula musculară scheletală produce glicoproteina B. Glicoproteinele sintetizate de cele trei tipuri de celule sînt identice imunochimic datorită similitudinilor din segmentul polipeptidic extracelular. Cantitatea de N-CAM din culturile de celule nervoase este de 6 ori mai mare față de cea din culturile de miocite și de 20 de ori mai ridicată față de gliocite. Polipeptida formei A și B este o proteină membranară integrală, cu un domeniu (cea aminică) extern, un domeniu intralipidic și un domeniu (cea carboxilică) intern. Domeniul citoplasmatic este de circa 50 000 daltoni și, respectiv, de circa 25 000 daltoni și este fosforilat. Fosforilarea domeniului citoplasmatic sugerează că acest segment ar putea fi un loc important pentru controlul funcției celor două tipuri de N-CAM (forma A și B). Spre deosebire de celelalte două tipuri, *forma C* este o glicoproteină membranară periferică. Afinitatea formei *C* față de membrană crește în cursul dezvoltării postnatale, cînd se remarcă și o creștere cantitativă a formei C în raport cu formele A și B. Aceasta ar putea fi atribuită proliferării puternice a celulelor gliale după primele 18 luni de dezvoltare postnatală.

Recent, s-a putut demonstra că forma A (componenta de 180 Kd) de N-CAM este bogat sialilată la embrion și slab glicozilată la adult. În culturile de celule cerebeloase primare, anticorpii anti-N-CAM tip A prezintă reacții încrucișate atît cu neuroni, cît și cu astrocite și oligodendrocite. În cursul dezvoltării cerebelului, telencefalului și retinei, N-CAM — tip A este detectabilă pe cale *imunohistochimică numai* în celulele neuronale diferențiate (postmitotice). În contrast cu N-CAM-total, reacția nu este prezentă în celulele precursoare proliferative din zona ventriculară precum și în stratul granular extern primordial sau postnatal timpuriu. În celulele neuroblastomei C—1 300 *in vitro*, N-CAM tip A apare (pe cale imunofluorescentă) mai concentrată în punctele de contact adiacente dintre celule, în timp ce N-CAM tip B și C sînt distribuite mai uniform pe membrana plasmatică. Tratarea celulelor neuroblastomei (cultivate *in vitro*) cu dimetilsulfoxid (care stimulează diferențierea) induce o intensificare a reacției pentru N-CAM tip A. Aceste observații sprijină concluzia că N-CAM tip A apare selectiv în celulele nervoase mai diferențiate și sugerează un rol special al N-CAM tip A în stabilizarea contactelor celulare.

A fost identificată o nouă moleculă a adezivității celulelor (CAM) neurono-gliale desemnată prin indicativul *Ng—CAM (neuron-glia-cell adhesion molecule)*. Spre deosebire de CAM-urile primare (exemplu N-CAM, L-CAM, uvomorulina etc.), Ng-CAM este considerată o CAM *(cell adhesion molecule) secundară*, deoarece ea nu apare la suprafața neuronilor înainte de faza postmitotică și de migrarea lor din zona proliferativă. Ng-CAM este o glicoproteină de cca 200 Kd, izolată din creierul de mamifere și identică cu NILS extrasă din creierul de pasăre, precum și cu proteina L_1 extrasă din creierul de rozătoare.

Scanned with OKEN Scanner

Ng-CAM este abundentă îndeosebi pe axoni, cu precădere în cursul dezvoltării fasciculelor nervoase și nu pe corpul neuronal. Ea este implicată în migrarea neuronilor granulari în lungul gliocitelor radiare din cerebel, ca și în interacțiunile dintre neuroni. Spre deosebire de N-CAM, mecanismul de adezivitate a Ng-CAM pare a fi heterofil, adică Ng-CAM de pe o celulă poate atașa alte tipuri de molecule din matricea extracelulară sau de pe alte celule. Ng-CAM este abundentă în nervii periferici la embrion și perinatal, însă începe să se restrîngă în fibrele amielinice la adult. La microscopul electronic se poate constata că în fibrele amielinice Ng-CAM (ca și N-CAM) se concentrează în suprafețele de apoziție dintre axolemă și membrana celulelor Schwann. Coexistența Ng-CAM și N-CAM la nivelul suprafețelor de contact dintre axon și celulele Schwann, atît pe traiectul fibrelor amielinice și al joncțiunilor neuromusculare, sugerează că ambele molecule participă la adeziunea axonilor și a nervilor terminali, la celulele Schwann.

Concluzia principală, însă, a cercetărilor efectuate pînă în prezent este că factorul de creștere nervos (NGF) stimulează selectiv elaborarea Ng-CAM la suprafața fibrelor nervoase de mamifere, nu însă și a N-CAM. Constatarea că NGF stimulează elaborarea Ng-CAM și nu a N-CAM este prima dovadă că moleculele adezivității celulare pot răspunde selectiv la acțiunea factorilor de creștere. Faptul că elaborarea CAM-urilor poate fi indusă de factorul de creștere, constituie un stimul pentru a cerceta în continuare acțiunea altor factori de creștere care ar putea fi implicați în modularea elaborării de CAM-uri, precum și în controlul mecanismelor ce stau la baza organizării diferitelor țesuturi din organism.

A mai fost izolată o *a treia proteină* nervoasă cunoscută și sub indicativul J_1. Anticorpii față de J_1 marchează astrocitele însă nu și neuronii și *in vitro* interferează cu adezivitatea dintre neuroni și nevroglie. Această CAM pare diferită de N-CAM și Ng-CAM. Depozite de J_1 au fost observate în spațiile interstițiale ale celulelor musculare, în cursul dezvoltării embrionare pînă la naștere, dar dispar treptat la naștere. Totuși, se constată o reapariție a CAM-J_1 în regiunea sinaptică neuromusculară după denervare, în cursul regenerării plăcilor neuromusculare. Originea acestei CAM nu este clară.

9.5.5.3. Creșterea axonilor și formarea căilor nervoase

Clarificarea proceselor celulare care stau la baza constituirii cu atîta precizie a căilor nervoase care intră în componența sistemului nostru nervos a constituit o preocupare și a neurohistologilor clasici.

Ramon Y Cajal a fost primul preocupat de această problemă. El a descris proeminențele ameboide de la capătul axonilor embrionari, pe care le-a denumit *conuri de creștere*. Încă din 1910 Harrison a confirmat ipoteza creșterii axonale emisă de Cajal, descriind expansiunile conului de creștere în explantul de măduva spinării vie, cultivată *in vitro*. Atît Cajal cît și Harrison au observat că dezvoltarea proceselor axonale nu se face la întîmplare și că, dimpotrivă, expansiunea conurilor de creștere axonală se desfășoară în lungul căilor stereotipice, găsind și recunoscînd „țintele" lor cu precizie. Mai mult, ambii cercetători au presupus existența unei sensibilități chimice a conurilor de creștere pe baza căreia acestea își pot alege calea corectă de dezvoltare.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste idei au fost preluate ulterior de Sperry (1963), care invocă ipoteza chimioafinității pentru a explica de ce conurile de creștere ale celulelor ganglionare retiniene își găsesc ținta lor corectă în *tectum opticum*, în cursul regenerării la amfibieni. Sperry conchide că „dezvoltarea finală urmată de o fibră dată reflectă istoria unor serii continue de decizii, bazate pe afinitatea diferențiată a unor filamente avansate continuu (aceste filamente sînt astăzi denumite *filopodii)* pentru a sonda mediul în care progresează și diferite elemente tisulare pe care le întîlnește".

În ultima decadă s-a învățat mult despre structura și comportarea conului de creștere, prin studierea neuronilor disociați în culturi de celule *in vitro*. S-a dovedit astfel că în adevăr, în cursul dezvoltării lor, conurile de creștere axonale emit *filopodii* digitiforme care au 0,1 μm în diametru și circa 30 μm în lungime. Aceste filopodii radiază în toate direcțiile din conul de creștere, pentru a explora tranzitoriu mediul înconjurător. Cele mai multe au o viață scurtă și regresează prin reintoarcerea la conul de creștere. Totuși, unele persistă atunci cînd izbutesc să stabilească contacte și să adere în mod selectiv la suprafețe cu anumite caractere; acestea joacă un rol-cheie în ghidarea dezvoltării conului de creștere, Cu alte cuvinte, mai multe filopodii stabilesc contacte cu cîteva suprafețe întîlnite în mediul înconjurător: unele întîlnesc structuri la care aderă puternic, altele întîlnesc suprafețe la care aderă slab. Dacă adeziunea este slabă, în cursul fazei ulterioare ciclului lor, filopodiile sînt retrase; dacă aderența este puternică, filopodiile persistă și în faza contractilă. Contracția conduce la tensiuni care propulsează și ghidează conul de creștere în direcția plăcii de adezivitate. Deci, conurile de creștere pot fi ghidate în culturile de celule prin intermediul filopodelor care aderă selectiv la suprafețe, pe baza specificității lor chimice.

Datele obținute pe celule nervoase cultivate *in vitro*, au fost confirmate *in vivo*, în cadrul cercetărilor efectuate în cursul dezvoltării embrionilor de lăcustă și de *Drosophila*. Astfel, conurile de creștere ale anumitor neuroni manifestă afinitate selectivă pentru suprafețele unor neuroni specifici; astfel de specificități interneuronale (între conul de creștere a axonului unui neuron și suprafața pericarionului celui de al doilea neuron) dau naștere la traiecte stereotipice ale unor fascicule comune, specifice între două grupe de neuroni. Aceste cercetări susținute și de alte date, sugerează că în primele faze ale dezvoltării liniilor de celule nervoase, se stabilesc interacțiuni celulare care au la bază expresia treptată și diferențiată a unor molecule pe suprafața unor subseturi de neuroni, care pot fi recunoscute de axonii altor celule nervoase aflate în curs de dezvoltare și că aceste molecule chimice sînt specifice, stînd la baza organizării fasciculelor nervoase în mod selectiv.

Utilizarea metodelor imunochimice a făcut posibilă identificarea unor neuroni „exploratori" sau „celule-țintă" în cursul dezvoltării sistemului nervos. Urmărindu-se prin această metodă dezvoltarea celulelor nervoase „reper" a devenit clar că diferiții neuroni stabilesc segmente anumite ale traiectelor nervoase incipiente și că acești neuroni sînt inițial suficient de selectivi (restrictivi), în trimiterea de filopode din conurile lor de creștere, la celulele învecinate. Filopodele au putut fi vizualizate la microscopul electronic (cu ajutorul galbenului Lucifer) și s-a stabilit că ele aderă puternic de neuronii-„țintă". Aceste observații dovedesc că formarea fasciculelor nervoase este ghidată în mare măsură de adeziunea selectivă, mediată în parte prin mișcările secvențiale ale conurilor de creștere de la o celulă-„țintă"

Scanned with OKEN Scanner

la celula nervoasă următoare. Conurile de creștere ale unor neuroni diferiți vor manifesta selectivități diferite în punctele de ramificație și vor constitui căi diferite.

9.5.5.4. Structura internă a neuriților în cursul histogenezei lor

Cu toate că axonii și dendritele neuronilor *maturi* par a fi simple prelungiri fizice ale citoplasmei somei, chiar și examinarea sumară a structurii lor interne indică numeroase diferențe semnificative. De exemplu, din axoni sînt excluse organitele caracteristice pentru citoplasma somei, inclusiv aparatul Golgi, reticulul endoplasmic rugos și centriolii. Mai mult, elementele ultrastructurale care sînt prezente atît în somă cît și în neurit, cum este cazul microtubulilor (MT), filamentelor intermediare (FI) sau neurofilamentelor, reticulul endoplasmic neted (REN) și mitocondriile prezintă importante diferențe în organizarea lor. Axonul matur are un citoschelet foarte bine structurat și ordonat, în timp ce în citoplasma somală apar dezordonat distribuit.

Prin contrast, axonul *imatur* are mai multe caracteristici structurale similare citoplasmei somale decît axoplasmei axonului matur. Axonii pe cale de creștere conțin un mare număr de organite membranoase, au puțini neurotubuli și neurofilamente, au o structură internă puțin organizată, formă externă neregulată și sînt capabili de mari variații morfogenetice în comparație cu axonii maturi.

Un model interesant pentru studiul dezvoltării neuriților îl reprezintă culturile de celule de feocromocitom, linie cunoscută ca PC_{12}. Celulele PC_{12} sînt celule tumorale clonale, derivate din celulele cromafine ale adrenalei de șobolan. Ele provin din crestele neurale și nu-și pierd capacitatea de a forma neuriți. După tratarea cu factor de creștere nervos (NGF), celulele PC_{12} (ca și celulele cromafine normale) se diferențiază în curs de numai cîteva zile în neuroni simpatici colinergici, care prezintă axoni aparent normali. În sfîrșit, microcinematografierea cu tehnica încetinitorului a permis confirmarea faptului că dezvoltarea neuriților PC_{12} nu se deosebește cu nimic de cea a nervilor normali.

Mai mulți autori au descris modificările morfologice care survin în cursul diferențierii neuriților sub influența NGF în mai multe tipuri de neuroni, și îndeosebi în celulele PC_{12}.

Unele din evenimentele intracelulare ce par să aibă un rol esențial în creșterea și stabilizarea neuriților este *formarea unor fascicule de microtubuli*, care se extind de la corpul celulelor pînă la filopodele și/sau lamelopodele de la vîrful neuriților. Acest fapt a fost foarte clar dovedit prin administrarea factorului de creștere nervos liniei celulare de feocromocitom. În absența NGF, celulele PC_{12} au formă rotundă, le lipsesc prelungirile celulare și microtubulii nu sînt aranjați în șiruri paralele. După cîteva zile de tratament cu NGF, celulele nu mai proliferează, încep să se diferențieze, alungindu-se și emițînd prelungiri neuritice. Formarea neuriților este însoțită de apariția unor fascicule de microtubuli dispuși în șiruri paralele care se extind de la corpul celulei pînă la extremitatea neuriților. Aceste fascicule de microtubuli sînt cele mai proeminente ultrastructuri observate la microscopul electronic în celulele PC_{12} tratate cu NGF; sînt prezente și filamentele intermediare și microfilamentele, dar comparativ cu microtubulii, în cantitate mică. Deci, fasciculele de microtubuli reprezintă rețeaua citoscheletică principală a neu-

Scanned with OKEN Scanner

riților pe cale de creștere. Relația în timp între apariția fasciculelor de microtubuli și creșterea în lungime a neuriților sugerează o legătură cauzală între aceste evenimente. Presupunerea este sprijinită de experimentele farmacologice care dovedesc că agenții care previn formarea fasciculelor de microtubuli în neuroni sau în celulele PC_{12}, cum sînt colchicina și temperaturile scăzute, blochează de asemenea și creșterea neuriților. S-a putut arăta că stabilitatea microtubulilor din neuriții celulelor PC_{12} crește după tratamentul cu NGF, chiar și față de acțiunea depolimerizantă indusă de colchicină sau de scăderea temperaturii. Tratamentul prelungit cu NGF determină creșterea de 2—3 ori a cantității totale de *tubulină polimerizată* din celulele PC_{12}. Creșterea se înregistrează la 2—4 zile și continuă constant în zilele următoare.

Prezintă de asemenea un interes deosebit acțiunea NGF asupra comportării proteinelor asociate microtubulilor (MAP) în cursul creșterii neuriților, deoarece *in vitro* MAP stimulează stabilitatea microtubulilor și controlează organizarea lor în fascicule. Cercetările recente au dovedit că NGF stimulează creșterea a MAP_1, *tau* și îndeosebi a MAP_2, precum și a fosforilării unora din proteinele care aparțin clasei de MAP cunoscute sub denumirea de „cartine".

După o săptămînă de acțiune a NGF asupra PC_{12}, cînd neurotubulii devin componenta citoscheletală predominantă în neuriții aflați în creștere intensă, sinteza tubulinei crește de 2—3 ori iar sinteza *tau* și MAP_1, de 20 de ori. S-a demonstrat că MAP-urile catalizează polimerizarea NT pe seama tubulinelor din citosol. Tubulina liberă este mult mai abundentă în neuriții pe cale de creștere decît în neuriții maturi.

De regulă, neurofilamentele nu sînt o componentă dominantă în majoritatea tipurilor de neuriți. Microfilamentele de actină nu sînt o componentă structurală care să participe la determinarea formei neuriților în cursul creșterii lor, ci un material de legătură dintre diferitele organite. Reticulul endoplasmic neted nu se modifică semnificativ în cursul dezvoltării neuriților. Frecvența mitocondriilor este mai mare în neuriții tineri, în schimb, corpii denși sînt mai abundenți în neuriții maturi.

În consecință, modificările ultrastructurale interne, survenite în cursul dezvoltării neuriților sînt caracterizate prin două modificări principale. În primul rînd, NT, care definesc axul longitudinal al neuriților, cresc ca număr și determină o formă a neuriților mai regulată și cilindrică. În al doilea rînd, există schimbări importante în numărul relativ al celorlalte tipuri de organite care reflectă specializarea funcțională a neuriților. Aceste schimbări nu afectează însă în mod semnificativ forma neuriților în cursul dezvoltării lor. Distanța dintre NT și volumul matricei asociată organitelor rămîne constantă în cursul dezvoltării. Se poate deci conchide că numeroasele schimbări ultrastructurale petrecute în cursul dezvoltării neuriților, se datorează în esență unui mare număr de NT produs de celulă și că numeroși alți parametri, care ar putea interveni în determinarea formei neuriților, rămîn constanți.

Identificarea semnalelor utilizate de axonii aflați pe cale de creștere, pentru ca conurile lor de creștere să poată străbate un mediu celular foarte complex, prezintă un interes deosebit pentru înțelegerea mecanismelor care stau la baza stabilirii sinapselor nervoase și a construirii căilor nervoase. Au fost identificate și studiate modificările structurale, ultrastructurale și moleculare produse de un număr de *factori care contribuie la ghidarea con-*

Scanned with OKEN Scanner

rilor de creştere axonale. Printre acestea menţionăm: canalele şi barierele fizice, căile prestabilite genetic, ghidajul glial sau al aşa-numitor celule tecale, activitatea electrică neuronală şi cîmpurile electrice, precum şi mai multe tipuri de molecule (de pe neuron, de pe celulele-ţintă, din matricea extracelulară elaborată de alte celule), denumite generic mesageri sau factori *chimiotactici.*

Mesagerii chimiotactici sînt implicaţi în ghidarea conurilor de creştere axonale fie deplasîndu-se prin difuziune în funcţie de concentraţia lor, cum este cazul NGF (care sînt proteine mici), fie prin repartiţia pe membrane a unor molecule implicate în recunoaşterea şi adezivitatea celulară, ca în cazul moleculelor adezivităţii celulelor nervoase sau N-CAM. Prezenţa N-CAM la suprafaţa conurilor de creştere neuronale a fost identificată atît la microscopul optic prin colorаţii imunocitochimice cu aur coloidal, cît şi la microscopul prin imunofluorescenţă. Densitatea N-CAM este foarte mare la nivelul vîrfului unui anumit axon. S-a dovedit că N-CAM de la nivelul conului de creştere, şi îndeosebi de pe filopodele şi lamelipodele sale, mediază adezivitatea homofilică (stabilirea de legături N-CAM—N-CAM) în scopul organizării de fascicule de neuriţi în culturi de neuroni, pentru formarea nervului optic de către celulele ganglionare retiniene, pentru formarea de sinapse stabile între axoni şi miotubuli, precum şi în stabilirea de legături ale fibrelor retiniene cu prelungirile celulelor gliale din regiunea fibrelor optice.

Dat fiind faptul că densitatea N-CAM de pe toate filopodele unui anumit con de creştere este uniformă, se presupune că la organizarea fasciculelor nervoase (îndeosebi la alegerea unor anumite direcţii în dezvoltarea conului de creştere) participă şi alţi factori chimici care nu sînt sintetizaţi de neuroni (cum este cazul tubulinei, al proteinelor asociate microtubulilor şi al N-CAM), ci sînt sintetizaţi de aşa-numitele celule ale tecii reprezentate de celulele nevroglice şi fibroblaste, precum şi de celulele nepermanente care acced în mod temporar (exemplu: macrofagele şi leucocitele). Astfel s-a dovedit că *celulele tecii* din fibrele nervoase aflate în curs de dezvoltare, din fibrele nervoase mature şi din fibrele nervoase lezate, sintetizează şi secretă *şase* tipuri de proteine solubile: de 70 kD, 54 kD, 51 kD, 39 kD, 37 kD şi 30 kD. Sinteza proteinelor de *37 kD* creşte semnificativ atît în cursul dezvoltării căilor nervoase cît şi în cursul regenerării axonilor lezaţi. Expresia acestui tip de proteină pare să fie reglată de semnale pornite de la axon şi nu de la ţintă. Proteina de 70 kD este sintetizată exclusiv ca răspuns la axotomie, rolul său fiind limitat la unele aspecte ale reparării fibrelor nervoase. Proteinele de 54 kD şi de 51 kD apar numai în tecile fibrelor nervoase mature şi normale; sinteza şi eliberarea acestor tipuri de proteine este rapid inhibată după axotomie şi revine la normal după regenerarea nervilor, ceea ce sugerează integritatea funcţională a nervilor maturi.

În concluzie, cercetările recente dovedesc că maturarea şi creşterea axonilor (a traiectelor nervoase) necesită expresia secvenţială a unor proteine specifice asociate creşterii, cu rol de mesageri chimiotactici, care sînt elaborate atît de neuroni (tubulinele, MAP, N-CAM) cît şi de celulele tecii (proteinele solubile sus-menţionate).

De asemenea, recent s-a sugerat că *activitatea electrică neuronală* joacă un rol special în reglarea creşterii morfologice şi în alungirea conului de creştere. Astfel s-a dovedit că, în perioada care precedă stabilirea legăturilor funcţionale sinaptice între neuroni, potenţialul de acţiune modifică morfologia conului de creştere şi stopează mişcarea filopodelor. Această constatare a

Scanned with OKEN Scanner

fost confirmată și pe culturile de neuroni *in vitro*, stabilindu-se că la 15 minute de la aplicarea unui stimul nervos asupra unui neuron aflat în creștere activă, conul de creștere își retrage filopodele și-și suspendă extinderea. De asemenea s-a constatat că în cursul blocării extinderii conului de creștere (ca urmare a aplicării unui stimul electric), canalele ionice (care sînt active în conul aflat în plină creștere) sînt mascate. Este posibil ca evenimentele electrice sosite la conul de creștere să fie în stare să activeze molecule ce maschează canalele ionice necesare reglării creșterii normale a conurilor.

9.5.5.5. Factorii neurotrofici

Dezvoltarea și menținerea funcțiilor sistemului nervos sînt consecința interacțiunii concertate a unei mari varietăți de mecanisme reglatoare, de natură genetică și de natură epigenetică. Operațiile de transplantare și ablație experimentală, efectuate în cursul acestui secol, au demonstrat că se poate obține supraviețuirea neuronilor de vertebrate în curs de dezvoltare, *numai* ca urmare a influenței teritoriilor lor de inervație, deci a unor factori epigenetici. Pînă în prezent, totuși, numai un singur factor trofic a fost amplu studiat și s-a demonstrat a fi responsabil în mod neîndoielnic de așa-numita determinare epigenetică a supraviețuirii neuronale — este vorba de *factorul de creștere nervos* (FCN). Acesta este o proteină care s-a dovedit a fi necesară pentru supraviețuirea neuronilor periferici (senzoriali și a celor simpatici) aflați în curs de dezvoltare și s-a arătat că neutralizarea FCN endogeni prin anticorpi anti-FCN conduce la moartea acestor neuroni. În ultimii ani, pe lîngă FCN s-au identificat mai multe proteine în extrasele tisulare solubile, ca și în matricea extracelulară, care au rolul de a influența supraviețuirea și dezvoltarea unor tipuri de neuroni cultivați *in vitro* sau *in vivo*. Ansamblul factorilor identificați pînă în prezent, inclusiv FCN, poartă denumirea generică de *factori neurotrofici*.

9.5.5.5.1. Factorul de creștere nervos

Factorul de creștere nervos (FCN), indicat în literatura anglo-saxonă și sub inițialele NGF *(nerve growth factor)*, a fost detectat în urmă cu 30 de ani în mari cantități în glanda submandibulară a șoarecelui mascul, iar ulterior a fost identificat și în alte organe sau specii (inclusiv la om). Cercetările efectuate asupra FCN au condus în ultimii ani la elucidarea structurii *precursorului* FCN, precum și la clarificarea organizării sale genomice. Astfel, s-a arătat că partea principală a secvenței precursorului se află la extremitatea terminală aminică a beta-NGF (subunitate activă a moleculei de NGF), în vreme ce carboxilul terminal al argininei este urmat numai de doi aminoacizi. Regiunea care codifică beta-NGF reprezintă circa 1/3 din ARN-mesager precursor (ARNhn). Analiza organizării genomului uman și a celui de șoarece a arătat că gena NGF este prezentă ca o singură copie și că toate informațiile asupra secvențelor beta-NGF sînt localizate pe un singur axon. Mai mult, secvențele de aminoacizi omologe ale NGF de șoarece și de om, reprezintă peste 90 de procente, așa cum rezultă din secvențele genomice de ADN.

Cercetări recente au demonstrat existența unei corelații între densitatea inervației sinaptice și nivelul NFG în organele periferice-țintă; experiențe

Scanned with OKEN Scanner

cu celule cultivate *in vitro* au arătat că extinderea fibrelor nervoase simpatice *in vitro* este determinată de concentrația locală a NGF; în sfirșit, ritmul sintezei de NGF în organele-țintă este determinat prin reglarea producției ARNm specific pentru acest factor. Nu este încă, totuși, clar care sînt celulele din organele-țintă care efectuează sinteza NGF.

Cunoștințele referitoare la mecanismul care reglează sinteza și eliberarea NGF sînt fragmentare. Se pare că, spre deosebire de sinteza din glanda submaxilară de șoarece, sinteza NGF în organele efectoare periferice *nu* este controlată de androgeni. Mai mult, eliberarea FCN în iris nu depinde de influxul de calciu, ceea ce sugerează existența unei căi de elaborare esențială. După denervarea senzorială sau simpatică, se înregistrează o marcată creștere a FCN în organele-țintă. Cercetările experimentale au dovedit că FCN este transportat retrograd de la periferie la corpul celulei nervoase corespunzătoare. Relativ înalta concentrație a FCN din ganglionii simpatici nu se datorează capacității celulelor nervoase de a-i secreta, ci transportului retrograd de la periferie pe calea axonilor.

Segmentul din molecula FCN care se leagă de receptorul membranei axonale (pentru a fi introdus în axoplasmă și transportat apoi retrograd la pericarion) prezintă o secvență de aminoacizi identică la diferitele specii de animale (exemplu la șoarece și la bou). Reziduul de triptofan de la secvența 21 este esențial pentru activitatea biologică a FCN.

Mecanismul molecular de acțiune a FCN asupra celulei nervoase este încă incomplet elucidat, cu toate că s-au făcut progrese privitor la interacțiunea dintre NGF și receptorul de pe membrana axonală. Legarea NGF de receptorul său are drept consecință schimbarea greutății moleculare a acestuia din urmă de la 100 000 la 158 000. Această schimbare este însoțită de creșterea concentrației NGF, ca urmare a trecerii receptorului de la forma cu afinitate scăzută la forma cu afinitate înaltă.

9.5.5.5.2. Alți factori neurotrofici

Recent a fost identificat și purificat un nou factor neurotrofic (care acționează asupra troficității celulelor nervoase senzoriale), extras din creierul de mamifer și denumit *factorul cerebral*. Acesta, deși prezintă unele proprietăți fizico-chimice (greutate moleculară de 12 300; punct izoelectric >10,1) similare cu cele ale beta-NGF (greutate moleculară 13 259; punct izoelectric 9,3), are proprietăți imunologice și biologice deosebite de cele ale NGF: *a*) cele două molecule — cea a NFG și cea a noului factor cerebral — nu prezintă reacții imunologice încrucișate; *b*) activitatea maximă a celor doi factori asupra neuronilor senzoriali se manifestă în stadii diferite ale dezvoltării acestora; *c*) spre deosebire de NGF, factorul cerebral nu influențează supraviețuirea neuronilor simpatici însă stimulează supraviețuirea neuronilor retinieni, care nu sînt sensibili la NGF. Se consideră că *factorul neurotrofic extras din creier este capabil să exercite o acțiune trofică asupra neuronilor care-și trimit prelungirile în sistemul nervos central.*

Un alt factor neurotrofic a fost extras din coroidă, iris și corpul ciliar. Proprietatea sa principală este aceea de a stimula supraviețuirea și creșterea *neuronilor parasimpatici* (care nu răspund nici la acțiunea NGF și nici la cea a factorului cerebral). Întrucît acest nou factor a fost testat pe ganglionul ciliar,

Scanned with OKEN Scanner

este cunoscut și sub indicativul *CNTF* (*ciliary neurotrophic factor*). El are o greutate moleculară de 20 000, un punct izoelectric de 5 și este, din punct de vedere imunologic, clar diferit de NGF și de factorul cerebral. În privința proprietăților sale biologice, proteina extrasă din tunica mijlocie a globului ocular prezintă, comparativ, un spectru de acțiune nespecific, deoarece ea este activă atît asupra neuronilor simpatici și parasimpatici (asupra cărora nu acționează factorul cerebral), cît și asupra neuronilor senzitivi.

În afara identificării și purificării unor factori care influențează supraviețuirea neuronilor, au mai fost identificate și *molecule capabile să inducă proprietăți colinergice* neuronilor adrenergici ai animalelor nou-născute. O puternică activitate colinergic-inductoare o prezintă *celulele musculare cardiace*. Din mediile de cultură cu celule musculare cardiace, a fost izolată o proteină de 40—45 kD, care are o puternică activitate inductivă colinergică asupra neuronilor simpatici și care stimulează activitatea acetiltransferazei în neuronii colinergici.

De asemenea, s-au făcut progrese în ceea ce privește identificarea și izolarea unor molecule care acționează mai degrabă asupra fenotipului morfologic al neuronilor decît asupra capacității lor de a supraviețui. Astfel de molecule au proprietatea de a stimula creșterea prelungirilor celulelor nervoase, atît în culturi cît și în condiții experimentale *in vivo* (în organele denervate). Așa de exemplu, au fost identificate proteine solubile, extrase din creier, care stimulează creșterea prelungirilor nervoase ale neuronilor cerebeloși cultivați *in vitro*. De asemenea, a fost extrasă din mușchii denervați o proteină cu efect germinativ asupra fibrelor nervoase

9.5.5.6. Limitele neurogenezei la om

Se consideră, în general, că neuronii sistemului nervos adult uman sînt lipsiți de capacitatea de a se înmulți. Această aserțiune nu este verificată temeinic nici pe om și nici pe alte specii de primate. În ultimii ani au apărut cîteva rapoarte care sugerează că există totuși procese de înlocuire sau de adăugare de noi neuroni la unele specii de animale adulte ca peștii, amfibienii, păsările și chiar rozătoarele. Pornindu-se de la aceste rapoarte s-a acreditat ideea că ar fi posibil ca asemenea procese să aibă loc și la om. Trebuie spus că implicațiile funcționale ale unui asemenea fenomen, chiar și în ipoteza unui *turnover* sau a refacerii minime a neuronilor din creierul normal și al creierului lezat, fie la tineri, fie la adulți, ar avea o importanță practică enormă.

Într-un raport publicat recent de P. Rakic (*Science*, 1985, 227, 1 054—1 056), se face constatarea că analiza sistematică și amănunțită a histoautoradiogramelor, provenite de la maimuțe care au primit în faza postpuberală una sau mai multe injecții cu timidină marcată cu tritium și care au fost sacrificate la diferite perioade, între 3 zile și 6 ani, indică prezența unui *turnover* lent al celulelor gliale și *absența totală a radiomarcării neuronilor*. Pe această bază se trage concluzia că, spre deosebire de unele specii de vertebrate inferioare primatelor (și în mod special spre deosebire de neamniotice), toți neuronii creierului de maimuță se formează în viața prenatală și în cea postnatală timpurie. *O populație stabilă de neuroni* la primate, și *în mod special la om, prezintă o importanță deosebită pentru procesul continuu de învățare și memorizare care caracterizează specia umană.*

Scanned with OKEN Scanner

9.5.6. DEGENERAREA ŞI REGENERAREA

Neuronii sau celulele nervoase nu se pot regenera la adult. Cea mai mare parte dintre ei ajung la locul lor definitiv la sfîrşitul copilăriei şi la primate, inclusiv la om, dezvoltarea sistemului nervos este completă la pubertate. Axonii, prelungirile filiforme ale celulelor nervoase în lungul cărora circulă impulsul nervos, pot să se refacă după ce sînt alteraţi — însuşire care se află la baza redobîndirii lente a sensibilităţii şi a mişcării după unele leziuni —, dar aceasta are loc în general *numai în nervii periferici*. În creier sau în măduva spinării un traiect nervos se reface foarte rar.

Moartea unei celule nervoase se limitează la pericarionul şi prelungirile celulare proprii. Neuronii legaţi funcţional cu neuronul mort nu mor şi ei, cu excepţia acelora care au o singură legătură. În această ultimă ipoteză, neuronul suferă o *degenerare transneuronală*.

Spre deosebire de celulele nervoase, nevrogliile sistemului nervos central şi celulele Schwann, sau celulele-satelite din sistemul nervos periferic, sînt capabile să se dividă prin mitoză. Spaţiile din sistemul nervos central în care celulele nervoase au degenerat şi au murit, sînt ocupate de celulele nevroglice.

Deoarece nervii sînt larg distribuiţi în corpul omenesc, ei sînt adesea supuşi lezărilor. Cînd un axon nervos este secţionat, au loc schimbări degenerative urmate apoi de faza reparatorie.

La o fibră nervoasă periferică lezată este important să se observe schimbările care survin în *segmentul proximal*, comparativ cu cele din segmentul distal. Segmentul proximal, întrucît îşi păstrează continuitatea cu centrul trofic (pericarionul), regenerează de obicei. Segmentul distal, fiind separat de corpul celulei nervoase, degenerează total şi este preluat de macrofage (fig. 9.39).

Lezarea axonilor provoacă următoarele modificări în pericarion: *a*) cromatoliza, adică dezagregarea corpilor Nissl şi scăderea bazofiliei citoplasmatice; *b*) creşterea în volum a pericarionului; *c*) migrarea nucleului într-o poziţie periferică. Segmentul proximal axonal degenerează în vecinătatea leziunii pe o distanţă scurtă, însă începe să crească imediat ce macrofagele au preluat rămăşiţele degenerate.

În *segmentul distal* al leziunii nervului, atît axonul (separat de centrul său trofic), cît şi teaca de mielină degenerează complet şi rămăşiţele lor, exclusiv elementele conjunctive şi teaca perineurală, sînt înglobate de către macrofage (respectiv de microglie). În timp ce schimbările regresive au loc, celulele Schwann proliferează în teaca conjunctivă care persistă, dînd naştere unei coloane de celule nevroglice, cunoscute sub denumirea de cordoanele Büngner. Acest şir de celule Schwann servesc ca ghid pentru conul de regenerare axonal care se formează în faza reparatorie, pe seama segmentului proximal. Microgliile care au fagocitat elementele tisulare lezate elaborează un polipeptid — factorul de proliferare glială — care stimulează proliferarea celulelor Schwann.

După schimbările regresive, segmentul proximal al axonului, care este conectat cu centrul trofic (pericarionul), creşte şi se ramifică formînd numeroase filamente, care avansează în direcţia coloanei din celulele Schwann.

Scanned with OKEN Scanner

Numai acele prelungiri care pătrund în aceste coloane de celule Schwann vor continua să crească și vor ajunge la organul efector (fig. 9.39). Dacă există o mare distanță între segmentul distal și proximal sau dacă segmentul distal dispare complet (ca în cazul amputațiilor), fibra nervoasă nou crescută poate forma o masă bulboasă, denumită impropriu *neuron de amputație*.

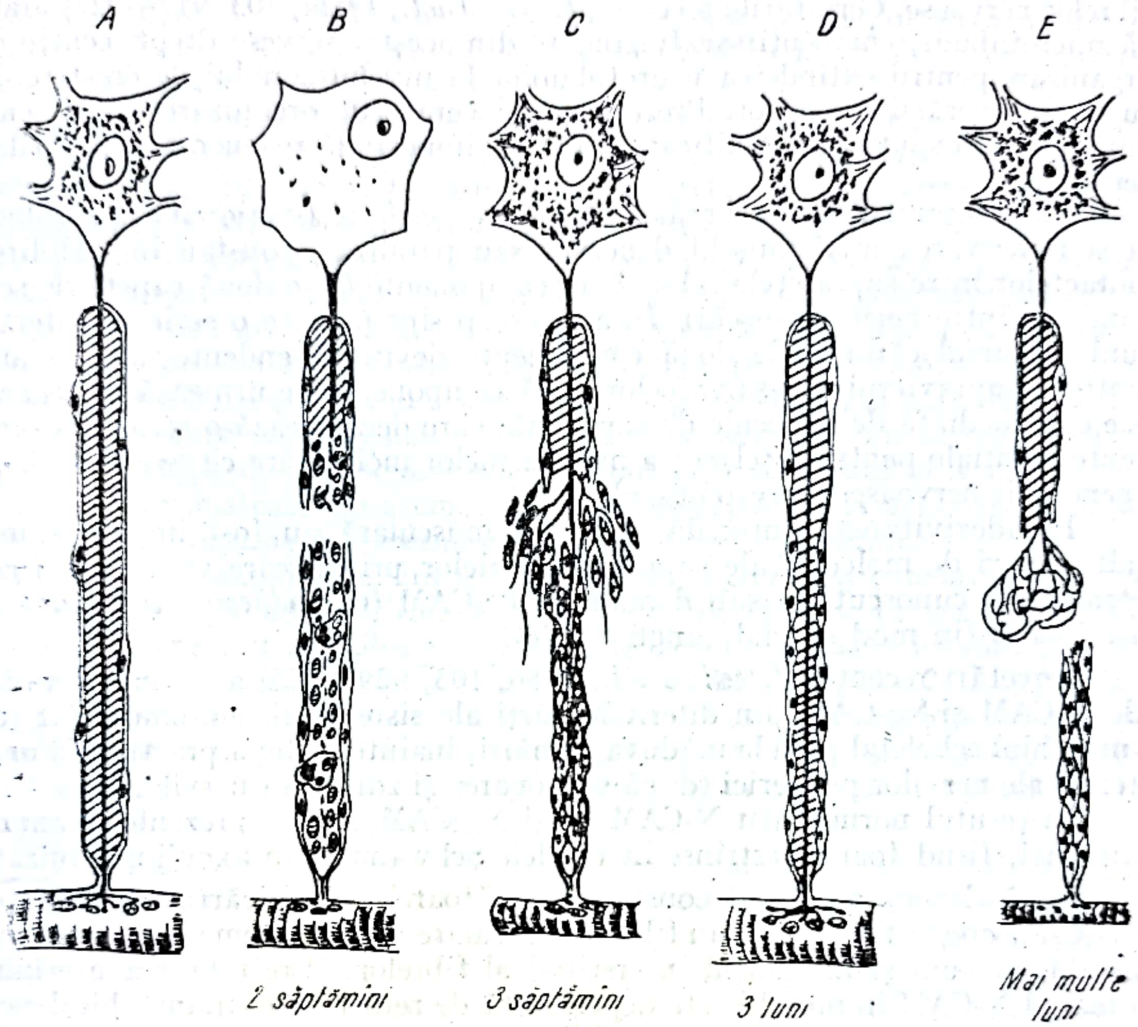


Fig. 9. 39. — Schema principalelor modificări în neuronul lezat: *A* — neuronul normal; *B*, *C*, *D* și *E* — modificările la diferite intervale de timp (pentru detalii vezi textul).

Se poate menționa că unii autori au remarcat fenomene de regenerare și la capătul distal al neuriților lezați, atunci cînd leziunile nu sînt prea ample. În aceste cazuri, segmentele distale se colapsează, scurtîndu-se și luînd aspectul unui „șirag de mătănii" din axoplasma cărora se dezvoltă ulterior neuriții, în mod similar cu dezvoltarea mugurilor terminali sau a conurilor de creștere. Această constatare face necesară identificarea centrilor organizatori ai neurotubulilor (care constituie substratul ultrastructural al organizării neuriților) din conurile de creștere atît distale cît și proximale. Un răspuns la această întrebare este necesar și pentru că s-a constatat că în cursul lezării neuriților se petrec ample degradări ale neurotubulilor — neurotubulii se des-

Scanned with OKEN Scanner

fac în subunitățile componente (ca urmare a secționării sau a zdrobirilor), ca și cînd ar fi introduse într-o moară de măcinat (după expresia lui Kirschner, 1980). Dacă sînt capabili să se refacă (în condiții excepționale, este drept) chiar și neuriții complet despărțiți de corpul neuronal, înseamnă că la nivelul mugurilor terminali de amputație sau la nivelul conurilor de creștere există toate informațiile necesare reorganizării citoscheletului pe parcursul regenerării fibrelor nervoase. Cercetările recente (*J. cell. Biol.*, 1986 , 103, 917—927) arată că microtubulii remanenți sau fragmente din aceștia servesc drept centre de organizare pentru extinderea neurotubulilor la nivelul conului de creștere, în cursul regenerării neuriților. Prezența unor centre de organizare insuficiente sau absența lor întîrzie semnificativ sau face imposibilă regenerarea unor fibre nervoase.

Faza terminală a regenerării unui nerv periferic (secționat sau zdrobit), ca și reinervarea unui mușchi denervat sau paralizat, constau în stabilirea contactelor între suprafețele celor două componente (cele două capete de secțiune sau între nerv și mușchi). În acest scop sînt inițiate o serie de interacțiuni în cursul cărora cele două componente devin dependente una de alta pentru a supraviețui. Atașarea celor două componente ce urmează să regenereze este mediată de molecule de suprafață, care declanșează o serie de evenimente esențiale pentru înțelegerea mecanismelor moleculare ce se află la baza regenerării nervoase și neuromusculare.

În adezivitatea neuronală sau neuromusculară au fost implicate mai multe tipuri de molecule ale suprafeței celulelor, printre care vom aminti *glicoproteinele*, cunoscute și sub denumirea de CAM (*cell adhesion molecules*) și *glicolipidele* (în mod special gangliozidele).

Cercetări recente (*J. cell. Biol.*, 1986, 103, 929—945) au urmărit variațiile N-CAM și Ng-CAM din diferitele părți ale sistemului neuromuscular (de la mușchiul scheletal pînă la măduva spinării) înainte și după practicarea unor alterări ale nervilor periferici (după secționarea și zdrobirea nervilor).

În țesutul normal atît N-CAM cît și Ng-CAM au fost prezente în axonii amielinici, fiind foarte restrînse în celulele Schwann și în axonii mielinizați.

După denervare se pot constata următoarele modificări: *a*) cantitatea de N-CAM crește tranzitoriu în fibrele musculare (pe sarcolemă ca și în sarcoplasmă), precum și în spațiul interstițial al fibrelor; *b*) restabilirea nivelului normal al N-CAM în mușchi este dependentă de reinervație; în mușchii denervați cronic, nivelul N-CAM rămîne ridicat; *c*) după secționarea sau zdrobirea nervului, cantitatea de CAM crește în zona din jurul leziunii iar forma de N-CAM predominantă în nervul matur (cea de circa 185 kD) este înlocuită prin forma embrionară, mai bogată în acid sialic și distribuită difuz. Atrage atenția faptul că după alterarea nervului sciatic, atît nivelul N-CAM cît și cel al Ng-CAM cresc puternic în celulele Schwann. În această perioadă, celulele Schwann migrează și proliferează, fiind posibil ca producția crescută de Ng-CAM în aceste celule să determine migrarea în jurul leziunii. Apariția CAM-urilor în jurul celulelor Schwann adiacente poate fi în legătură cu constituirea cordoanelor Büngner. Este de asemenea posibil ca prezența Ng-CAM din tubul endoneural să favorizeze extinderea axonului aflat pe cale de regenerare. Cantitatea de N-CAM și Ng-CAM revine la normal de îndată ce începe remielinizarea segmentului regenerat; *d*) există o corelație între schimbarea distribuției CAM-urilor și modificarea corpilor Nissl din celulele ganglionului spinal și din neuronii măduvei spinării, după secționarea nervilor

Scanned with OKEN Scanner

periferici. Localizarea ambelor CAM la suprafața neuronilor (spinali și medulari) coincide cu constituirea conului de emergență și cu evoluția cromatolizei substanței Nissl.

În concluzie, cercetările efectuate sugerează că semnalele dintre neuroni și gliocite sînt controlate de apariția CAM în neuronii și în fibrilele nervoase aflate pe cale de regenerare. De asemenea regenerarea este controlată și de apariția N-CAM în fibrele musculare. Aceste descoperiri pot avea aplicații practice prin utilizarea diferitelor tipuri de CAM în recuperarea unor afecțiuni neuromusculare degenerative.

Proteinele asociate creșterii și dihotomia regenerării nervilor. Dacă este zdrobit nervul optic de broască sau de pește, axonii proveniți din retină se vor regenera pentru a forma legături sinaptice în creier, și a restabili vederea animalului respectiv. Dacă este tăiat nervul optic la un iepure sau la o persoană, axonul lezat va forma muguri scurți, care vor persista cîteva zile dar nu vor putea parcurge în continuare segmentele care conduc la regenerarea nervului. Aceasta este, de fapt, o curioasă *dihotomie filogenetică* între sistemul nervos al vertebratelor anamniotice (amfibieni și pești), la care mulți axoni ai SNC regenerează foarte bine, și SNC al amnioticelor (reptile, păsări și mamifere, inclusiv omul), la care cea mai mare parte din căile nervoase nu se regenerează. Lipsa capacității de regenerare din sistemul nervos central al vertebratelor superioare contrastează de asemenea cu nervii periferici la aceleași specii, la care creșterea viguroasă a axonilor după lezări este prezentă.

În diferiți axoni care sînt capabili să regenereze s-a constatat inducția unor proteine nervoase specifice. Proteinele induse specific în timpul dezvoltării sau regenerării axonilor sînt denumite generic *proteine asociate creșterii* (PAC) și ele au o greutate moleculară de 43—49 kD și de 23—26 kD. Se pare că reglarea sintezei proteinelor din grupul PAC-24 este efectuată pe calea interacțiunii dintre neuron și ținta sa sinaptică, în vreme ce sinteza proteinelor din grupul PAC-43 este controlată fie pe calea unor reglatori strict intrinseci, fie pe calea interacțiunii glie-axon.

Transplantarea în sistemul nervos central. Cu toate că SNC (creierul și măduva spinării) manifestă o capacitate proprie redusă de regenerare, pe parcursul ultimei decade s-au adus dovezi că și acesta este totuși capabil să manifeste fenomene de creștere de un anumit fel.

Într-o serie de experiențe efectuate îndeosebi pe șobolan, s-a dovedit că grefele de țesut nervos *embrionar* pot fi anatomic și funcțional încorporate în sistemul nervos central al adultului. Interacțiunile dintre grefe și sistemul nervos-gazdă au dezvăluit multe elemente asupra factorilor care guvernează dezvoltarea și regenerarea în SNC. Succesele unor transplantări experimentale au sugerat de asemenea posibilitatea de a trata afecțiuni care în prezent sînt incurabile, ca maladiile Parkinson și Alzheimer, în care se petrec degenerări ale unor părți din SNC.

Principiul general, stabilit pe baza experimentelor de transplantare efectuate pînă în prezent, este că cea mai mare șansă de supraviețuire o au transplantele de țesut embrionar ai cărui *neuroni* se află în *faza de proliferare* sau *de migrare* și înainte de a-și fi început diferențierea, adică extinderea axonilor și dendritelor. Deoarece diferitele părți ale creierului se dezvoltă în etape diferite, vîrsta optimă a animalului donator variază după tipul de grefă ce se urmărește. Vîrsta animalului-gazdă (a transplatului) are mult mai puțină importanță asupra supraviețuirii țesutului transplantului decît factori ca stabili-

Scanned with OKEN Scanner

tatea fizică a implantului și disponibilitățile de surse de vascularizație pe care le găsește grefa.

O condiție care s-a dovedit ca avînd mai puțin efect asupra supraviețuirii transplantului decît s-a sperat, este gradul de înrudire între donor și animalul-gazdă. În alte domenii ale aplicării grefelor, respingerea imunologică survine prompt dacă donorul și gazda nu sînt foarte strîns înrudite. Conform acestui principiu, experimentele cu transplante de alte organisme efectuate anterior, nu s-au putut face cu succes decît dacă animalele erau foarte strîns înrudite sau identice din punct de vedere genetic. Am învățat ulterior că în SNC respingerea imunologică a grefelor nu are loc nici chiar atunci cînd animalul donor și cel receptor sînt genetic diferite. În adevăr, spre deosebire de alte tipuri de organe, transplantele SNC pot reuși și între animale de specii diferire, îndeosebi dacă animalul receptor a fost tratat cu droguri imunosupresoare ca ciclosporina.

Observația că SNC este un teritoriu „imunologic privilegiat" pentru transplantare nu își are originea în grefele de neuroni. Cercetări anterioare indicaseră că grefe de piele și de tumori pot supraviețui în creier chiar și la animalele care resping prompt grefe similare pe piele. Se presupune că accesul sistemului imun la țesutul străin transplantat în creier este limitat, deoarece *a*) creierul este lipsit de vase limfatice și de ganglioni limfatici (din care se dezvoltă cele mai multe celule ale sistemului imun) și *b*) deoarece peretele vaselor sanguine din SNC este specializat sub formă de „barieră hematoencefalică".

În cazul transplantelor neuronale, absența respingerilor reflectă de asemenea unele caracteristici proprii celulelor nervoase. Este cunoscut, de exemplu, că moleculele de antigeni de histocompatibilitate majoră din clasa I (care sînt moleculele pe care sistemul imun le recunosc ca străine cînd resping grefele altor țesuturi) sînt în mod normal rare sau absente de pe suprafața celor mai multe tipuri de neuroni.

Introducerea în practica curentă a transplantelor de țesut nervos a deschis calea studiului interacțiunii acestuia cu gazda. Pe această cale au fost identificați unii factori care stau la baza răspunsului SNC la unele leziuni.

Este știut de exemplu, că diferența între capacitatea de regenerare a axonilor nervilor periferici față de axonii SNC la vertebratele superioare este în legătură cu faptul că tecile lor de mielină sînt edificate de celule nevroglice deosebite. Nervii periferici sînt mielinizați de celulele Schwann iar nervii centrali, de oligodendrocite. S-a sugerat că oligodendrocitele secretă substanțe care inhibă creșterea axonilor pe cînd celulele Schwann stimulează creșterea axonilor. S-a dovedit ulterior că celulele Schwann secretă proteine ca *laminina* care facilitează dezvoltarea axonilor în culturi de celule și de asemenea că, în urma lezării nervilor periferici, celulele Schwann produc *factorul de creștere nervos* care susține supraviețuirea și creșterea fibrelor în unii nervi periferici. De asemenea a fost testată posibilitatea ca gliile periferice să efectueze regenerarea fibrelor distruse din SNC, prin transplantarea unui fragment de nerv sciatic într-o zonă a măduvei spinării din care a fost excizată o porțiune corespunzătoare. S-a constatat că după cîteva luni, o bună parte din fibrele centrale secționate și-au refăcut legăturile, ca urmare a efectului stimulator exercitat de fibrele sciaticului transplantat (respectiv al celulelor Schwann).

Consecințe similare de regenerare și restabilire a legăturilor nervoase centrale lezate îl au și transplantele de țesut embrionar în creierul de adult.

Scanned with OKEN Scanner

Transplantarea unui fragment de *hippocampus* embrionar în locul unei porțiuni de fimbria (excizată în prealabil) are drept consecință refacerea fibrelor colinergice din hipocampul receptor adult. Aceasta dovedește că țesutul embrionar poate acționa ca o punte pentru stimularea creșterii axonilor din SNC. Efectul țesutului embrionar se datorează în mod special capacității sale de a secreta factorii de creștere, adică substanța care stimulează dezvoltarea fibrelor nervoase-„țintă" din sistemul nervos adult.

S-au identificat două tipuri de modificări neurochimice care apar în sistemul nervos, după ce s-au practicat leziuni, și care stau la baza rapidei refaceri produse de transplante.

Pe de o parte, se produce o creștere a ritmului de sinteză și de eliberare a neurotransmițătorilor în fibrele nervoase care supraviețuiesc. Pe de altă parte, crește sensibilitatea neuronilor-țintă la micile cantități de transmițători care mai sînt secretați. Această „supersensibilitate de denervație" care este urmarea creșterii numărului de receptori pentru neurotransmițători pe suprafața celulelor-țintă, va crește capacitatea de supraviețuire a fibrelor lezate (de exemplu anumite fibre dopaminergice în maladia Parkinson, a anumitor fibre colinergice în cazul maladiei Alzheimer etc.).

În sfîrșit, s-au obținut succese experimentale spectaculare în anumite boli endocrine, prin transplantul de celule endocrine în sistemul nervos central (grefele de celule endocrine în alte țesuturi sînt fie respinse, fie necesită doze mari de imunosupresive care sînt toxice). Astfel de succese s-au obținut în tratamentul unor maladii ca diabetul zaharat, prin transplantul de medulosuprarenală și în unele defecte metabolice ereditare cunoscute sub denumirea de tezaurismoze. În concluzie, implantările în țesutul imunologic privilegiat care se limitează la SNC, permit supraviețuirea și funcționarea mai multor tipuri de celule, cu un rol important în desfășurarea activităților normale ale organismelor.

9.5.7. BAZELE ULTRASTRUCTURALE ALE TRANSPORTULUI AXONAL

Cercetările cu ajutorul microscopului electronic de înalt voltaj au condus la elucidarea *organizării ultrastructurale a matricei axoplasmatice*. După cum se știe, axonul este sărac în organite citoplasmatice membranare și în ribozomi, dar conține o matrice abundentă. Matricea este alcătuită din: *a*) o rețea *microtrabeculară* filamentoasă; *b*) un *citoschelet* format din neurofilamente, microtubuli și microfilamente și *c*) *citosol* compus din apă, electroliți și proteine solubile care pătrund prin ochiurile rețelei microtrabeculare și ale citoscheletului.

Rețeaua *microtrabeculară* alcătuită din filamente cu diametrul de 4—6 nm și lungimea de 10—100 nm, formează o țesătură complexă, distribuită între elementele citoscheletale (neurofilamente și neurotubuli), axolemă și organitele axoplasmatice.

Citoscheletul cuprinde trei componente orientate în lungul marelui ax al axonului: *a*) mănunchiuri de *neurofilamente* așezate în centrul axonului și conectate prin legături microtrabeculare transversale; *b*) grupuri de *neurotubuli* suspendați lîngă și printre neurofilamente; *c*) *o rețea densă de microfilamente citoscheletale subaxolemale*, groasă de 8—10 nm, care este ancorată,

Scanned with OKEN Scanner

pe de o parte, de proteinele integrale din axolemă și, pe de altă parte, de celelalte două componente citoscheletale (neurotubuli și neurofilamente).

Matricea axoplasmatică este sediul *transportului axoplasmatic* prin care se realizează mișcările și deplasările unor molecule proteice, electroliți și organite citoplasmatice. Transportul este bidirecțional, de la pericarion către partea terminală axonală (transportul anterograd sau proximo-distal) și în sens invers, pe aceeași cale (transportul retrograd sau distalo-proximal) — acesta din urmă pentru materialele care trebuie să ajungă din nou în corpul neuronal pentru reciclare.

În funcție de viteza de deplasare, transportul axonal este sistematizat în două tipuri: *a*) *fluxul axonal lent*, unidirecțional, de la pericarioni către extremitatea axonală terminală și *b*) *transportul axonal rapid*, care este bidirecțional.

Primul cunoscut a fost *fluxul axoplasmic lent* care se desfășoară cu viteza de 2,3—4,6 nm/s și care se realizează prin mișcări coerente ale matricei axonale. Pe această cale sînt transportate subunitățile proteice care compun diferite părți ale rețelei trabeculare sau ale rețelei citoscheletale. Aceasta înseamnă că fluxul axoplasmic lent corespunde vitezei de creștere a axonului, precum și celei de înlocuire a proteinelor matriceale. De asemenea, prin fluxul axonal lent sînt vehiculate anterograd și unele enzime ca enolaza sau creatinnosfokinaza.

Transportul axonal rapid se efectuează cu viteze care se crede că variază între 0,2 și 58 micrometri/s, este bidirecțional (atît anterograd cît și retrograd) și are la bază consumul de ATP, adică de energie. Pe această cale sînt transportate diferite complexe macromoleculare, organitele celulare, precum și veziculele care conțin neurotransmițători. Viteza de transport pentru un anumit tip de organit este constantă atît în neuronii senzitivi cît și în cei motori și indiferentă de lungimea axonului. Pînă relativ recent s-a crezut că viteza variază în funcție de mărimea organitelor — pentru organitele mai mari viteza fiind mai redusă și deplasarea de aspect saltator, iar pentru cele mai mici, viteza fiind mai mare și deplasarea de aspect continuu. Cercetări foarte recente (Valle și colab. — *Cell*, 1985, *40*, 449—462 și 559—569) dovedesc că: *1*) viteza de deplasare este apropiată pentru toate tipurile de organite, indiferent de mărimea lor; *2*) deplasarea continuă este modalitatea cea mai frecventă; *3*) microtubulii constituie, în mod neîndoielnic, substratul transportului rapid și *4*) o proteină solubilă denumită *kinezină* reprezintă translocatorul, adică mașinăria care pe baza hidrolizei ATP-ului induce deplasarea organitelor sau a veziculelor anterograd sau retrograd, în lungul neurotubulilor.

Folosirea unor agenți antimitotici, dezagreganți ai microtubulilor, cum ar fi colchicina, vinblastina, vindesina, griseofulvina, podofilotoxina, maitansina, nocodazolul (Brinjoin, 1982) a dovedit că aceștia blochează transportul axonal rapid și deci că microtubulii au un rol activ în realizarea migrării axonale a diferitelor particule.

Transportul axonal rapid este *reglat de diferiți ioni*, în special ionii bivalenți de *calciu*, ca și ionii de *magneziu*. Ionii de calciu sînt necesari menținerii transportului axonal, conlucrînd în acest sens cu calmodulinele. Scăderea concentrației calciului la 25% din cantitatea normală duce la diminuarea cu 60% a transportului axonal total de proteine (Hammerschland și colab., 1975). Ionii de calciu se găsesc fie liberi în pericarioni, de unde prin fluxul axonal rapid sînt deplasați în axoni, fie sub formă de calciu sechestrat în mitocondrii

Scanned with OKEN Scanner

și reticulul endoplasmic, fie legat de unele proteine axonale. Organitele și proteinele care sechestrează ionii de calciu acționează menținînd nivelul calciului liber în citoplasmă, la valorile sale normale. Alături de ionii de calciu, în transportul axonal rapid intervin și ionii de magneziu. Cei doi ioni bivalenți activează ATP-aza (Ca^{2+}—Mg^{2+}— ATP-aza), enzima care utilizează ATP-ul pentru generarea energiei mișcării de-a lungul microtubulilor. Ionii de calciu și de magneziu intervin asupra activității ATP-azei prin intermediul calmodulinelor, molecule care pot fi strîns legate de enzimă (Ochs, 1982), sau pot fi prezente pe filamentele de transport.

Transportul axonal rapid cuprinde și *transportul retrograd* distalo-proximal, care se desfășoară de la axoni către pericarioni. Transportul retrograd are două funcții majore: una de returnare a moleculelor endogene către pericarioni și alta de transfer informațional.

Returnarea moleculelor endogene care au fost sintetizate în pericarion și au migrat în axoni. Acestea revin în corpul celulei neuronale pentru degradare și resinteză, deci intră în procesul permanent de reciclarea a lor în celula nervoasă (Bisby, 1982). În neuronii motori 50% din proteine intră în transportul axonal retrograd. Nu se știe încă dacă transportul retrograd începe la capătul terminal axonal sau se realizează de-a lungul întregii axoplasme, deși Bray și colab. (1971) menționează capătul distal axonal ca principal loc de reîntoarcere a proteinelor (50% față de cele 70% ajunse la acest nivel). În drumul lor retrograd, proteinele nu suferă clivare proteolitică, ci numai alterarea conformațională a structurii terțiare. Aceasta poate duce, în cazul enzimelor, la pierderea activității lor, de exemplu a dopamin-beta-hidroxilazei din neuronii adrenergici.

Prin transportul retrograd se reîntorc în pericarioni membrane incluzînd și membranele sinaptice, după descărcarea neurotransmițătorilor, sau membrane care urmează a fi degradate sau restaurate. De asemenea, prin transport retrograd ajung în pericarioni unii agenți patogeni cum sînt virusul herpesului și al rabiei, toxina tetanică și alții, deseori transportați cu ajutorul lizozomilor axonali.

Transportul retrograd este asemănător cu cel anterograd în ceea ce privește viteza, sensibilitatea la ioni, la metaboliți și droguri, dar împachetarea materialelor pentru cele două direcții diferă, ceea ce permite aceleiași molecule să fie recunoscută preferențial de una din cele două căi.

Transferul informațional. Moleculele endogene se reîntorc prin axoni la corpul celular neuronal, cu informații de la nivelul distal la cel proximal. Pe această cale sînt returnate și unele proteine enzime ca: acetilcolinesteraza, monoaminoxidaza, fosfataza acidă. Prin transport retrograd se pot deplasa distalo-proximal și moleculele exogene proteice care ajung în axoplasmă din mediul periaxonal. Acestea duc neuronului un plus de informații privind mediul pericelular. Transportul retrograd al acestor molecule exogene se realizează selectiv (Hendry și Hill, 1980) și pare a fi legat și de instalarea unor neuropatii, demonstrate experimental la animale de laborator, dar și la om, pentru unii agenți patogeni ca toxina tetanică, virusul poliomielitei, virusul rabiei, virusul herpesului, care folosesc această cale de acces către sistemul nervos central. Ținînd seama de existența în nervi a transportului rapid retrograd, s-a sugerat folosirea lui în scop terapeutic, făcîndu-se deja unele încercări încununate de succes în acest sens, prin administrarea de agenți antivirali (Hashke și colab., 1980).

Scanned with OKEN Scanner

9.6. SISTEMUL NERVOS PERIFERIC

9.6.1. GENERALITĂȚI

Sistemul nervos periferic este alcătuit din *ganglioni*, *nervi* și *terminații nervoase*. Ganglionii sînt formațiuni rotunjite care cuprind corpul celulelor nervoase (*celulele ganglionare*) împreună cu celulele lor de susținere (*celulele capsulare*) și fibrele nervoase care sosesc sau pleacă de la celulele nervoase respective. În sistemul nervos periferic există două tipuri principale de ganglioni: *ganglioni senzoriali* (senzitivi) sau aferenți și *ganglioni autonomi* (vegetativi) care cuprind corpul celulelor neuronale eferente ale sistemului nervos autonom. Ganglionii senzoriali cuprind ganglionii cranieni, asociați cu unii din nervii cranieni, și *ganglionii spinali*, cunoscuți ca ganglionii rădăcinilor posterioare (sau dorsale) aflați pe traiectul rădăcinilor posterioare ale nervilor spinali.

Nervii periferici sînt alcătuiți din fascicule de fibre *nervoase* (care includ și celulele lor de învelire), precum și din diferite tipuri de țesut conjunctiv de acoperire. Cei mai mulți nervi conțin atît fibre nervoase aferente cît și eferente. *Terminațiiile nervoase* sînt de două feluri: *a*) *terminații aferente* asociate cu receptorii și *b*) *terminații eferente* care merg la fibrele musculare, la celulele secrətorii ale glandelor exocrine și la celulele țesutului adipos.

Sistemul nervos autonom. Dintre diferitele răspunsuri fiziologice inițiate de impulsul nervilor aferenți, numai contracția mușchilor scheletali se află sub controlul voinței. Toate celelalte răspunsuri sînt reglate automat, scăpînd controlului voinței noastre. În consecință, inervația eferentă a sistemului circulator, a glandelor exocrine și a viscerelor este denumită generic *sistem nervos autonom* (gr. *auton* = auto, propriu; *nomos* = lege). Restul sistemului nervos, care cuprinde căile senzoriale precum și centrii și căile de transmitere a răspunsurilor motorii voluntare corespunzătoare, este cunoscut ca *sistem nervos somatic*.

Sistemul nervos autonom se împarte în *simpatic* și *parasimpatic*. Mușchiul cardiac, cea mai mare parte din mușchii netezi și glandele exocrine sînt inervate de ambele diviziuni (sau tipuri) ale sistemului nervos autonom, cunoscută ca inervația simpatică și respectiv parasimpatică. Răspunsurile inițiate de activarea unui tip sînt în genere antagoniste celor efectuate de celălalt tip. Cele două tipuri se caracterizează printr-un lanț de *doi neuroni eferenți*, ambele celule nervoase fiind implicate în transmisia impulsurilor eferente de la sistemul nervos central la celulele inervate.

Corpul celulei primului neuron din lanț se află în sistemul nervos central, pe cînd cel de al doilea neuron se găsește în sistemul nervos periferic, într-un ganglion autonom. Datorită acestui aranjament, axonul primului neuron din lanț este denumit *fibră preganglionară*, iar cel al celui de al doilea neuron, *fibră* postganglionară.

Mediatorul chimic al sinapselor preganglionare simpatice și parasimpatice este acetilcolina.

Mediatorul chimic al fibrelor postganglionare din sistemul simpatic este *norepinefrina*, produsă și de medulosuprarenală. Secreția medulosuprarenalei are un efect similar cu cel al stimulării sistemului nervos simpatic. Fibrele nervoase *simpatice* postganglionare pot fi puse în evidență la micro-

Scanned with OKEN Scanner

scopul de fluorescență (fig. 9.40) ca urmare a acțiunii vaporilor de formol asupra aminelor biogene din aceste fibre. Ele au un aspect moniliform, deoarece butonii adrenergici sînt distribuiți ca mărgelele pe traiectul întregii fibre.

Mediatorul chimic eliberat de terminațiile nervoase pre- și postganglionice ale sistemului parasimpatic este *acetilcolina*. Acetilcolina este rapid inactivată de acetilcolinesterază — fapt pentru care stimularea parasimpaticului are o acțiune mai discretă și mai restrînsă decît stimularea simpaticului. Reacția pentru acetilcolinesterază permite evidențierea fibrelor nervoase parasimpatice (fig. 9.41).

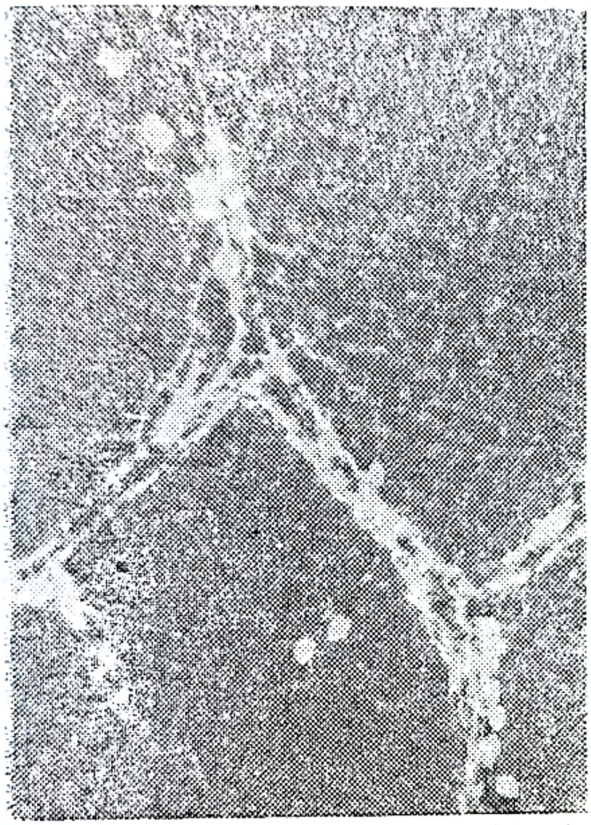


Fig. 9.40. — Plexuri nervoase simpatice perivasculare (noradrenergice) din țesutul adipos alb. Imagine la microscopul de fluorescență. Fibrele nervoase perivasculare au devenit fluorescente ca urmare a acțiunii vaporilor de formol asupra noradrenalinei din varicozitățile de pe traiectul fibrelor postganglionare. Petele albe, rotunjite se datorează fluorescenței prezentată de mastocitele perivasculare și tisulare.

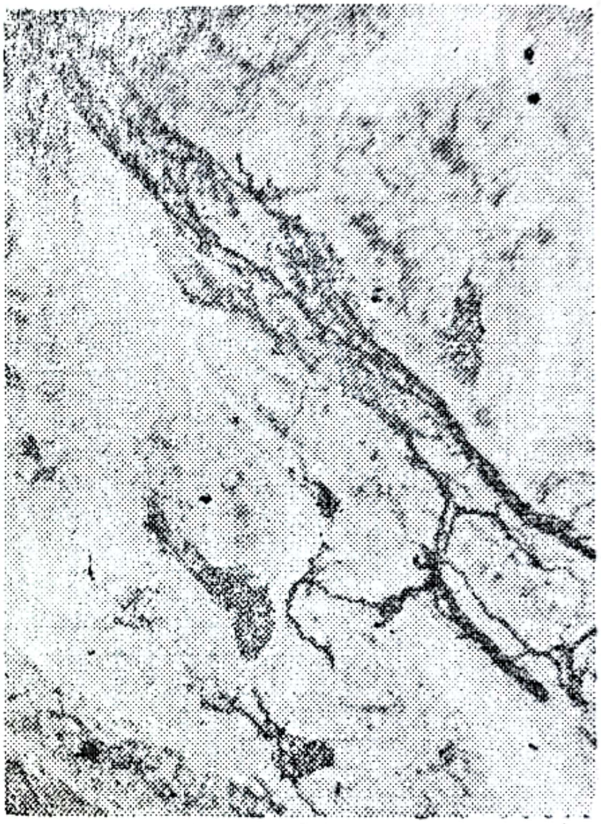


Fig. 9.41. — Plexuri nervoase parasimpatice perivasculare (colinergice) din parotidă. Fibrele nervoase colinergice sînt evidențiate prin reacția pentru acetilcolinesterază.

9.6.2. GANGLIONII CRANIOSPINALI

Ganglionii craniospinali se află pe traiectul rădăcinilor dorsale ale nervilor spinali și pe traiectul unor nervi cranieni. Funcția lor este de a transmite sistemului nervos central impulsuri generate de diferiți receptori senzoriali.

Scanned with OKEN Scanner

Ganglionii craniospinali (fig. 9.42) au neuroni pseudounipolari, ale căror prelungiri se ramifică în T, dînd o ramură ce constituie axonul care pătrunde în sistemul nervos central și o ramură periferică ce are o arborizație dendritică la nivelul receptorului periferic. În acest fel, dendritele nu sînt expansiuni ale corpului celular ci ale axonului. Impulsul nervos merge direct de la periferie la sistemul nervos central, scurtcircuitînd pericarionul. Astfel, pericarionul neuronului pseudounipolar nu primește impulsuri nervoase, funcția lui fiind preponderent trofică. Prelungirea axonală unică a acestei celule efectuează cîteva bucle în jurul corpului celular înainte de a se ramifica. Ramificația survine în afara capsulei, formate de celulele-satelite care sînt celule nevroglice turtite ce încapsulează pericarionul.

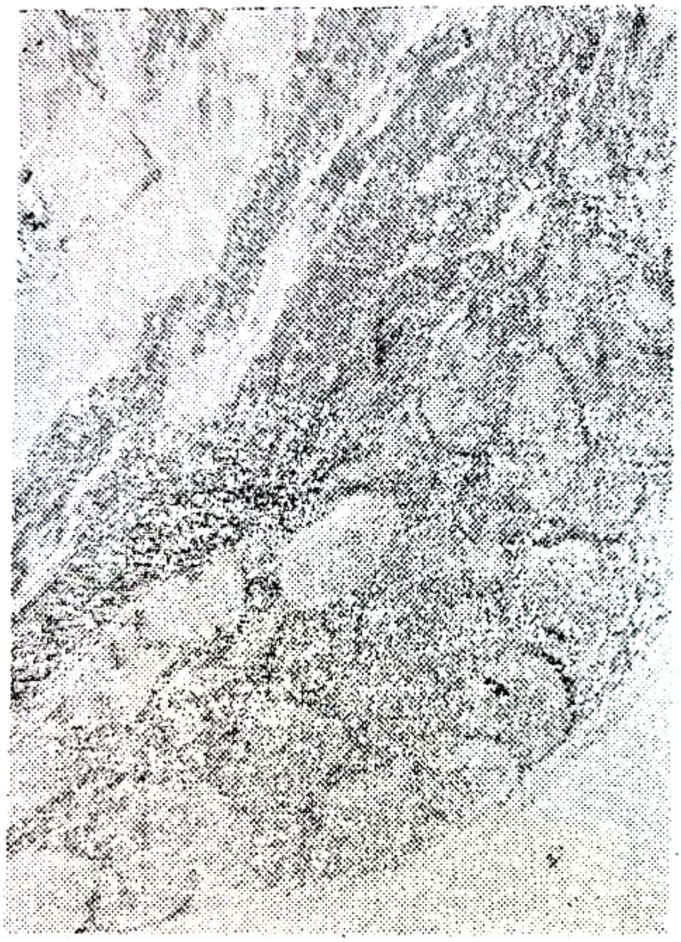


Fig. 9.42. — Secțiune în ganglionul spinal (colorație pentru evidențierea fibrelor de mielină); la periferie capsula conjunctivă necolorată. Pericarionii, sub capsulă, apar slab colorați, de formă rotunjită, cu nucleul mare, veziculos, în care se distinge nucleolul intens colorat. Fibrele nervoase se mielinizează îndată ce părăsesc capsula nevroglică perineuronală și se adună în fascicule, în centrul ganglionului.

Ganglionul nervului acustic este singurul ganglion cranian ai cărui neuroni sînt bipolari. În cursul dezvoltării celorlalți ganglioni craniospinali, neuronii, inițial bipolari, devin unipolari ca urmare a fuzionării prelungirii axonale cu cea dendritică și constituie prelungiri în formă de T.

Ganglionii craniospinali conțin grămezi de celule nervoase rotunjite, fie de talie mică, de 15—30 μm, fie de talie mare, de 120 μm. Printre acestea au fost identificate și rare celule multipolare (Diculescu, 1953, 1957, 1961). Pericarionii sînt aglomerați de preferință la periferia ganglionului, formînd o zonă corticală săracă în fibre nervoase. Partea centrală a ganglionului prezintă o mare predominanță de fibre nervoase mielinice, care formează o zonă medulară în care se află rari pericarioni.

În secțiunile histologice, pericarionii neuronilor pseudounipolari apar ca formațiuni globulare. Locul de emergență a prelungirii nervoase se vede

Scanned with OKEN Scanner

rar. Acești neuroni de obicei au corpii Nissl fini, incluziuni lipofuscinice, un nucleu mare și clar, cu un nucleol foarte evident. Rare celule nervoase se colorează intens datorită acumulării de heteroproteine (Diculescu, 1957).

9.6.3. GANGLIONII AUTONOMI

Ganglionii autonomi se prezintă ca dilatări fuziforme pe traiectul nervilor autonomi periferici. Unii sînt localizați în peretele unor organe, în mod special în peretele tubului digestiv sau al vezicii urinare, constituind așa-numiții *ganglioni intramurali* (fig. 9.43). Ganglionii intramurali sînt lipsiți de capsulă conjunctivă în jurul lor, celulele lor fiind suportate de stroma orga-

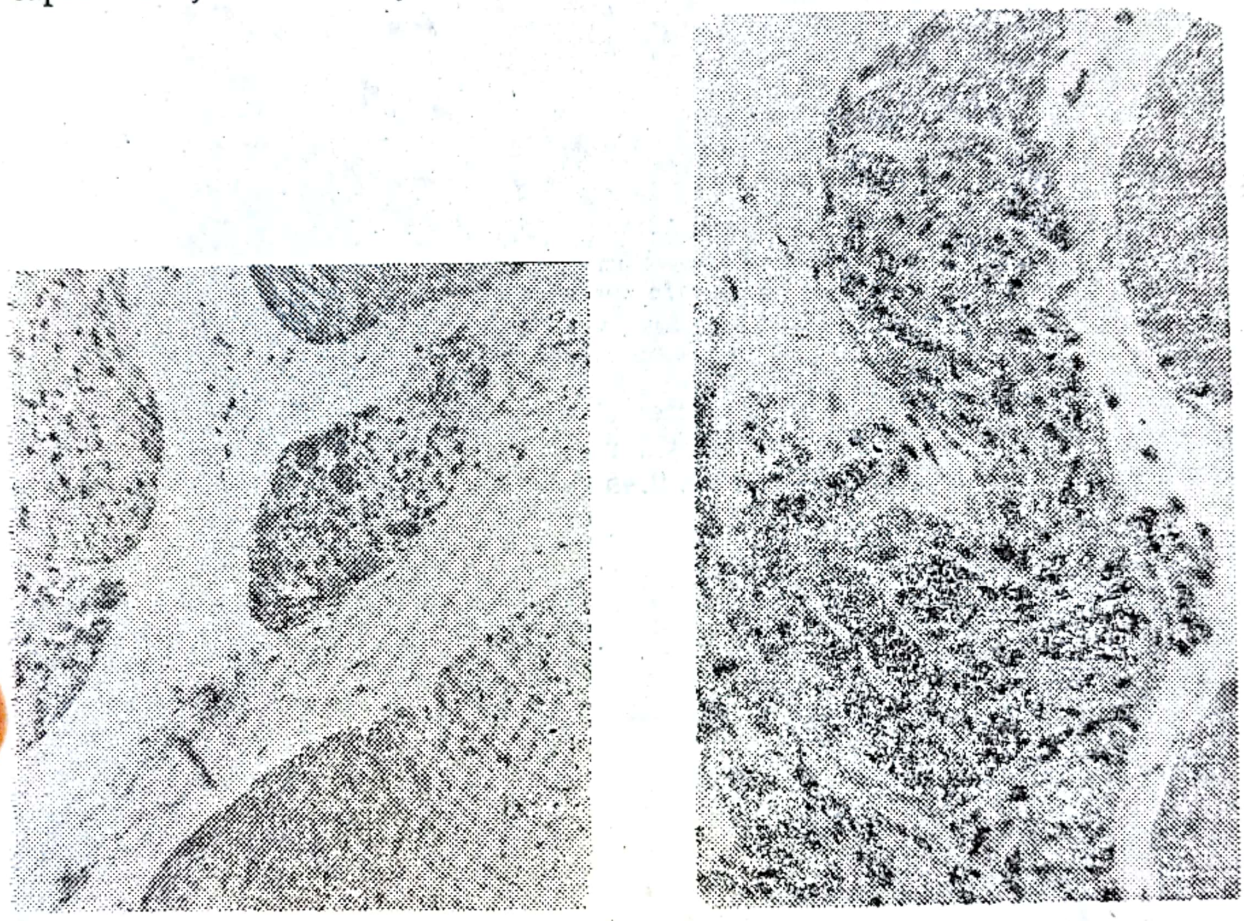


Fig. 9. 43.

Stînga — Ganglion intramural (parasimpatic) în musculara vezicii urinere. Coloraţie HE: Dreapta — detalii din figura 9.43 stînga.

nelor în care ei se găsesc. Fiecare pericarion dintr-un ganglion intramural este înconjurat de cîteva celule nevroglice satelit (fig. 9.44). Acești ganglioni aparțin de obicei sistemului nervos autonom parasimpatic.

Ganglionii nervoși ai lanțului paravertebral sînt *ganglioni nervoși autonomi*, care aparțin sistemului *simpatic*. Spre deosebire de ganglionii spinali, corpul celulelor ganglionilor simpatici nu au o localizare preferențială, la periferie, și, în consecință, acești ganglioni nu prezintă o zonă corticală și alta medulară. De obicei ganglionii simpatici conțin *neuroni multipolari* care apar în formă de stea pe secțiunile histologice, iar fibrele nervoase din acești ganglioni nu sînt mielinizate. Celulele-satelite perineuronale sînt frecvente dar

Scanned with OKEN Scanner

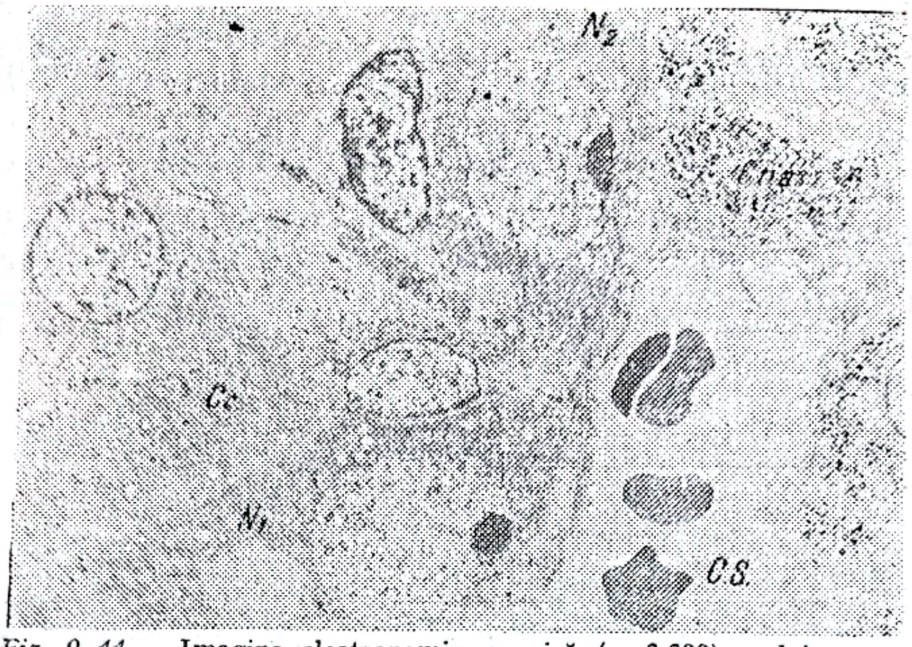


Fig. 9. 44. — Imagine electronomicroscopică (× 3 300) a doi neuroni (N_1 și N_2) în medulosuprarenală;
Cc — celulă capsulară (nevroglică); *CS* — capilar sanguin: *Cna* — celulă secretoare de noradrenalină.

formează o capsulă incompletă, datorită numeroaselor prelungiri care o perforează. Nucleul este mare, veziculos dar excentric. Corpii Nissl sînt mai abundenți și au aspect mai grosolan (fig. 9.45 și 9.46).

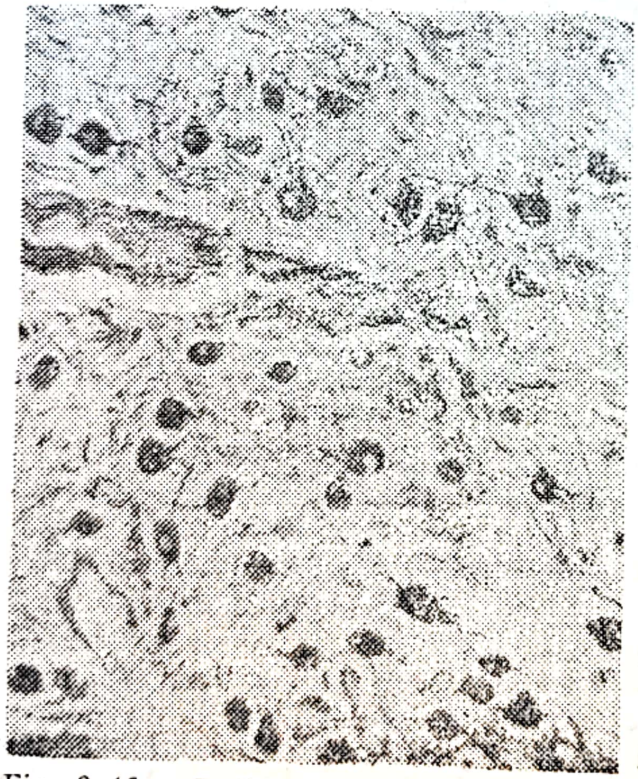


Fig. 9. 45. — Secțiune în ganglion simpatic din lanțul paravertebral (impregnație argentică): pericarionii trimit mai multe prelungiri. Ganglionul nu este organizat în zonă corticală (celulară) și zonă medulară (fibroasă).

Fig. 9. 46. — Detalii din figura 9.45.

Scanned with OKEN Scanner

9.6.4. NERVII

În sistemul nervos periferic fibrele nervoase sînt grupate în fascicule care formează *nervii*. Cu excepția cîtorva nervi foarte fini, alcătuiți din fibre nervoase amielinice, majoritatea nervilor periferici au un aspect albicios, deoarece sînt alcătuiți din fibre mielinizate (fig. 9.47).

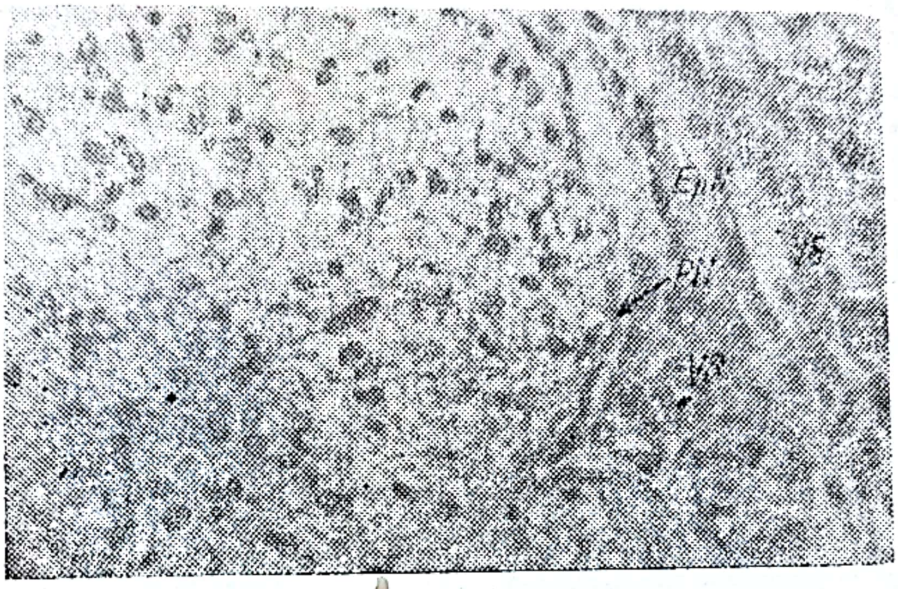


Fig. 9.47. — Imagine microscopică a unei secțiuni transversale într-un nerv mielinic periferic colorat cu HE: se observă un fragment dintr-un fascicul nervos mare și două fascicule mici. Fiecare fascicul este înconjurat de perinevru *(PN)* iar la suprafața lor se află epinevrul *(EpN)*, în care se remarcă vase sanguine *(VS)*. În interiorul fasciculelor se disting: nuclei de celule Schwann și fibre nervoase secționate transversal. În centrul fibrei nervoase de aspect punctiform, se află axonul; spațiul clar din jurul său este locul tecii de mielină (care a fost extrasă în urma prelucrărilor histologice, în vederea obținerii secțiunii microscopice); la periferia fibrei se remarcă teaca formată de celula Schwann, reprezentată prin nucleul său heterocromatic și o lamă citoplasmatică fină.

Nervii au un înveliș fibros extern de țesut conjunctiv dens, denumit *epineurium* sau epinevru, care umple de asemenea spațiile dintre fasciculele de fibre nervoase. Fiecare fascicul este înconjurat de un *perineurium* sau perinevru, o manșetă formată din celule conjunctive fibrocitare turtite, asemenea unor celule epiteliale. Fibrocitele din fiecare strat al tecii perineurale sînt legate între ele prin joncțiuni strînse, aranjament ce face ca perineuriumul să fie o barieră de trecere pentru mai multe tipuri de molecule. Sub teaca perineurală se află axoni acoperiți de celule Schwann și de elemente conjunctive care constituie *endoneuriumul* sau endonevrul. Elementele conjunctive ale endonevrului constau din membrane bazale, care înconjură tecile de celule Schwann, și fibre de reticulină care constituie împreună așa-numitele teci Key și Retzius. Atît fibrele de reticulină cît și membranele bazale ale endonevrului sînt sintetizate de celulele Schwann (fig. 9.48 și 9.49).

Nervii stabilesc legături de comunicație între centrii nervoși și organele de simț sau organele efectoare (mușchi, glande etc.). Ei posedă fibre aferente

Scanned with OKEN Scanner

și eferente care fac legătura cu sistemul nervos central. Fibrele aferente transportă informațiile obținute din interiorul corpului sau din mediul extern, la centrii nervoși. Fibrele eferente transmit impulsurile de la sistemul nervos central la organele efectorii aflate sub comanda acestor centri. Nervii care posedă numai fibre senzoriale (aferente) sînt denumiți *nervii senzoriali;* cei alcătuiți numai din fibre care transmit impulsuri efectorii sînt denumiți

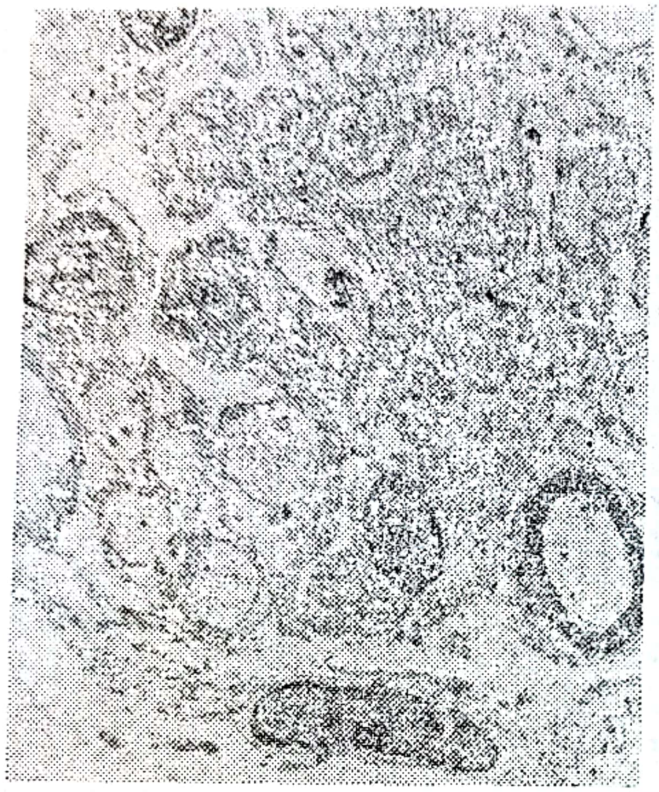


Fig. 9.48. — Imagine electronomicroscopică a unei secțiuni transversale (× 1 600) printr-un nerv periferic amielinic: numeroși axoni amielinici (secționați transversal) sînt înconjurați de lame de celule Schwann. Se pot observa și trei nuclei de celule Schwann. Printre fibrele nervoase se remarcă fibre de colagen fine și membrane bazale care constituie *endonevrul* sintetizat de celulele Schwann. La suprafața fasciculului nervos (la periferia imaginii) este un fibrocit (de aspect mioid) care aparține lamei perineurale. Într-un colț, se află o fibră nervoasă secționată transversal cu o teacă de mielină subțire — aceasta este o fibră nervoasă parasimpatică.

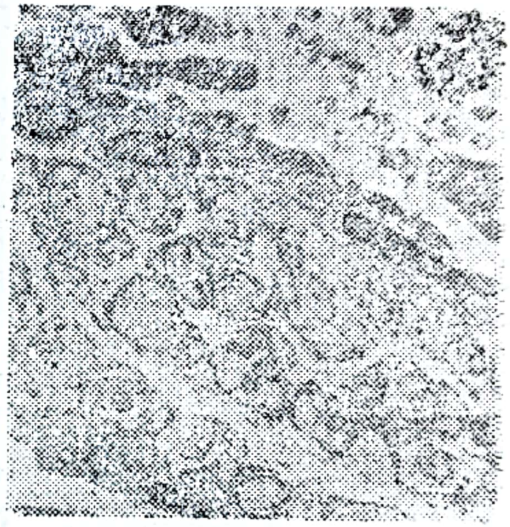


Fig. 9.49. — Imagine electronomicroscopică (× 1 000) a unei secțiuni transversale printr-un nerv periferic amielinic: un fascicul nervos este constituit din numeroase fibre nervoase amielinice, secționate transversal, și din endonevru; la suprafață se află *perinevrul*, alcătuit din fibrocite organizate strîns într-o lamă celulară continuă.

nervi motori. Numeroși nervi din organism au fibre atît motorii cît și senzoriale, fiind denumiți *nervi micști*. Nervii micști pot avea atît fibre mielinice cît și fibre amielinice.

Fibrele nemielinice. Nu toți axonii din nervii periferici sînt mielinizați. Atunci cînd conducerea rapidă nu este necesară, celulele Schwann care înconjură neurilema axonilor nu produc teaca de mielină. Nu numai atît, fiecare celulă Schwann adăpostește mai mulți axoni care se invaginează în șanțuri individuale, săpate în citoplasma unei singure celule și nu cîte o celulă Schwann

Scanned with OKEN Scanner

pentru fiecare axon, cum se întîmplă în cazul fibrelor mielinice. Datorită acestui aranjament, celula Schwann nu poate să se rotească în jurul fiecărui axon pentru a produce mielina. În schimb, celulele Schwann constituie coloane lungi care suportă și protejează axonii în șanțurile de la suprafața lor. Mai mult, axolema fiecărui axon este expusă liber contactului cu fluidul care ocupă spațiul intercelular dintre axon și *șanțul din membrana nevrogliei* în care este adăpostit. Impulsul nervos se deplasează în lungul unui astfel de axon în mod continuu, aceasta fiind o cale de transmitere a impulsului mai puțin rapidă față de mecanismul de conducere saltatorie de la nivelul axonilor mielinici.

Aspectul fibrelor nervoase periferice în secțiunile colorate cu hematoxilină-eozină. Secțiunile în nervii periferici pregătite prin includerea la parafină sînt expuse extracției lipidelor și deci în astfel de secțiuni, locul ocupat de tecile de mielină apare ca un spațiu gol, în jurul axonului. Nu poate fi evidențiată teaca de mielină decît folosind acidul osmic ca fixator care conservă și colorează în negru componenta lipidică a acestei teci. În secțiunile colorate cu hematoxilină-eozină este totuși posibil să fie sesizată teaca formată de corpul celulelor Schwann, care înconjură la exterior spațiul mielinei extrasă prin includerea la parafină.

Nucleii care se disting în jurul fasciculelor nervoase aparțin celulelor Schwann, fibroblastelor și celulelor endoteliale ale capilarelor sanguine care irigă nervul respectiv. Micii nervi periferici, secționați longitudinal sau oblic, au un aspect caracteristic „în valuri", accentuat de rețeaua vălurită a dispoziției nucleilor Schwann. Acest aspect ne permite să deosebim, pe secțiunile histologice, fasciculele de fibre nervoase de cele de mușchi neted. În sfîrșit, trebuie precizat că fibrele nervoase aferente și cele eferente nu pot fi distinse pe secțiunile histologice.

Fibrele nervoase autonome. Fibrele nervoase parasimpatice preganglionare vin din sistemul nervos central pe calea unor nervi cranieni și a nervilor sacrali. Fibrele nervoase preganglionare simpatice vin pe calea nervilor toracici și lombari. Ambele tipuri de fibre preganglionare sînt (slab) mielinizate, pe cînd ambele tipuri de fibre postganglionare sînt nemielinizate.

9.7. ORGANIZAREA GENERALĂ A ȚESUTULUI NERVOS ÎN SISTEMUL NERVOS CENTRAL

9.7.1. SUBSTANȚA CENUȘIE ȘI SUBSTANȚA ALBĂ

În secțiunile microscopice efectuate prin organele sistemului nervos central, țesutul nervos se prezintă sub două aspecte denumite *susbstanța cenușie* și *substanța albă*. Cele două aspecte ale țesutului nervos din sistemul nervos central pot fi recunoscute și cu ochiul liber (fig. 9.50).

Scanned with OKEN Scanner

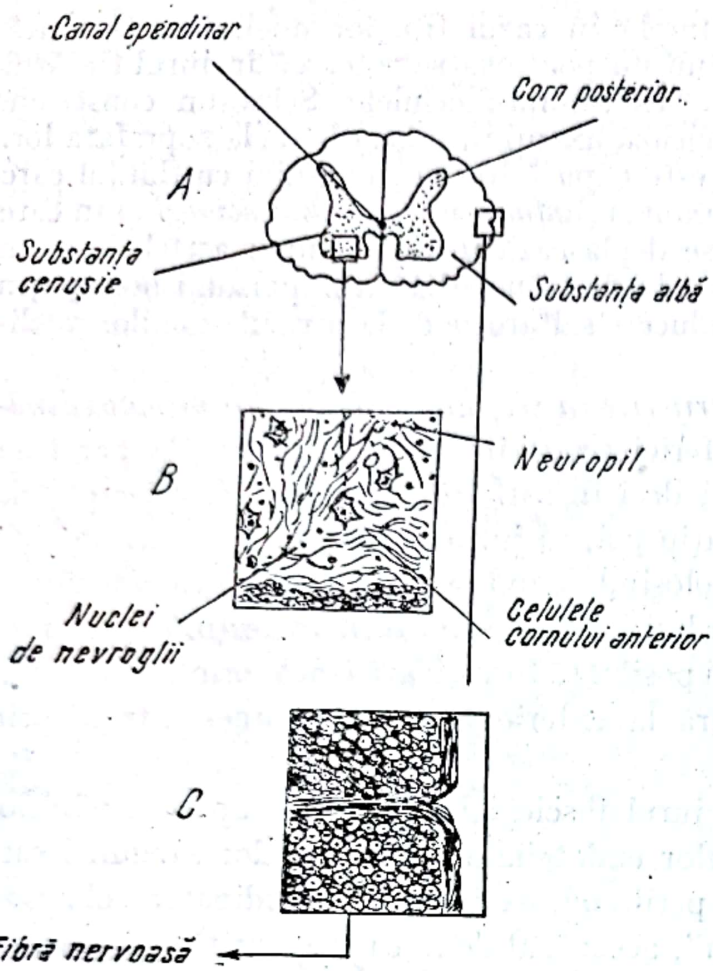


Fig. 9.50. — Reprezentare schematică a organizării generale a măduvei spinării:
A — secțiune transversală; *B* — detalii asupra substanței cenușii; *C* — detalii asupra substanței albe.

9.7.1.1. Substanța cenușie

În substanța cenușie, *corpul neuronilor* și nevrogliile sînt înconjurate de o țesătură de fibre nervoase și de prelungiri nevroglice care dau consistență întregii mase de materie cenușie. Această țesătură de fibre este alcătuită în cea mai mare parte din prelungirile dendritice și porțiunea proximală a axonilor care *nu* sînt mielinizați. Țesătura de fibre distribuită printre corpul celulelor nervoase din substanța cenușie este cunoscută sub denumirea de *neuropil*, datorită țesăturii sale în formă de pîslă (gr. *pilos* = pîslă). Între membranele plasmatice ale neuronilor și cele ale prelungirilor nevroglice se află un spațiu de circa 20 nm, prin care circulă un lichid cu compoziție similară celei a lichidului cefalorahidian.

În secțiune transversală prin *măduva spinării*, substanța cenușie se află în zona centrală și are o formă care sugerează litera „H" de tipar. Brațele „H"-ului constituie coarnele (sau coloanele) bilaterale anterioare și posterioare ale măduvei, iar piesa transversală formează comisura cenușie care leagă coarnele. Situat în centrul comisurii, *canalul central* al măduvei este parțial obliterat și uneori vizibil.

Corpul neuronilor este prezent în substanța cenușie, nu însă și în substanța albă. Cornul anterior al măduvei spinării este foarte potrivit pentru studiul substanței cenușii, deoarece conține mari celule motorii, cunoscute sub denumirea de celulele cornului anterior. Culoarea cenușie a acestei substanțe se datorează absenței fibrelor mielinice.

Scanned with OKEN Scanner

9.7.1.2. Substanța albă

În secțiune transversală, în măduva spinării substanța albă înconjură „H"-ul format din substanța cenușie. Aspectul său alb în stare proaspătă se datorează alcătuirii sale din *axoni mielinizați*, aranjați longitudinal, în tracturi ascendente și descendente. Mielina este un amestec de lipide și proteine, iar lipidele sînt extrase în cursul preparării secțiunilor la parafină. De aceea, în secțiunile colorate cu hematoxilină și eozină, tot ce se observă în tecile de mielină este un număr de spații rotunde, fiecare cu un axon secționat transversal în interiorul său. Mielina poate fi observată prin fixarea în tetraoxid de osmiu, care o conservă și o colorează în negru. În interstițiul dintre axonii mielinici ai substanței albe se găsesc ocazional nucleii alungiți ai oligodendrocitelor, celule care formează mielina în sistemul nervos central.

Repartiția substanței cenușii și a substanței albe. După cum s-a arătat, în măduva spinării substanța cenușie se află în centru iar cea albă, la periferie. În creier însă, în cursul dezvoltării sale, numeroase celule nervoase precursoare (neuroblastele) iau o poziție superficială în tubul neural, unde dau naștere unui strat lamelar de neuroni la suprafață, cunoscut ca *scoarța* creierului. Ca urmare, corpul a numeroase celule nervoase din emisferele cerebrale și din cerebel alcătuiesc un strat de substanță cenușie la suprafață, iar alte grupuri de celule se plasează sub formă de nuclei în profunzimea creierului, ca în măduva spinării. În concluzie, în creier, substanța cenușie se află atît la suprafața substanței albe, alcătuind scoarța cerebrală, cît și în profunzime, alcătuind nucleii cerebrali.

9.7.2. NUCLEII CEREBRALI SAU GRUPELE DE NEURONI CENTRALI

Aglomerările de neuroni de același tip în sistemul nervos central sînt denumite în mod curent *nuclei*, termen care nu trebuie confundat cu nucleii celulelor nervoase (vezi fig. 9.65). Neuronii acestor nuclei provin din regiuni bine delimitate ale neuroepiteliului embrionar și se formează în perioade bine delimitate, în timpul ontogenezei. Din aceste regiuni, neuroblaștii postmitotici (dar încă imaturi) migrează în poziția definitivă, unde se agregă cu neuroni de același tip. Mecanismele moleculare ale acestei agregări celulare selective nu sînt pe deplin cunoscute, ele fiind deosebit de complexe. De fapt, în aproape fiecare centru care a fost foarte atent studiat la adult, se găsesc două sau mai multe tipuri de celule nervoase. Un tip de celule nervoase care pot fi definite ca *celule principale* dau naștere în mod obișnuit unor axoni eferenți, care fac legătura între masa respectivă de neuroni (nucleul respectiv) și alte regiuni ale sistemului nervos central. Acești neuroni au axoni relativ lungi și sînt de obicei cele mai mari celule din nucleul respectiv. Adeseori, dar nu întotdeauna, fibrele nervoase aferente nucleului se termină pe dendritele sau pe soma celulelor principale. De obicei în nuclei mai există o a doua populație de celule nervoase, de cele mai multe ori mai mici decît celulele principale. Această a doua populație de celule se consideră că reprezintă *interneuroni*, care sînt fie interpuși între fibrele aferente și celule principale, fie între axonii colaterali ai celulelor principale și alte celule principale adiacente. În primul caz interneuronii sînt excitatori, iar în cel de al doilea, inhibitori. Interneuronii sînt de obicei celule Golgi tip II; alteori sînt neuroni fără axoni care acționează prin „dendrite presinaptice".

Scanned with OKEN Scanner

9.7.3. SCOARȚA CEREBRALĂ

9.7.3.1. Generalități

Cele două emisfere cerebrale sînt principalele elemente componente ale creierului uman. Ele sînt aproximativ simetrice și legate între ele printr-o mare structură comisurală — corpul calos *(corpus callosum)*. În corpul calos există aproximativ 200 de milioane de fibre comisurale. De asemenea, emisferele sînt intim legate, prin fascicule nervoase puternice, de etajele imediat inferioare ale creierului, de marele complex de neuroni al talamusului și de ganglionii bazali. Ample căi ascendente și descendente — compuse din milioane de fibre nervoase — leagă emisferele cerebrale și talamusul cu etajele inferioare, adică cu mezencefalul, puntea, cerebelul, bulbul și măduva spinării. Descrierea detaliată a acestor căi nu face obiectul cursului de histologie.

În alcătuirea emisferelor cerebrale intră scoarța cerebrală care este o lamă de substanță nervoasă cenușie ce acoperă toate circumvoluțiunile emisferelor, însumînd o suprafață totală de 1 200 cm^2 pentru fiecare emisferă. Grosimea neocortexului este de circa 3 mm și reprezintă o maximă aglomerare de neuroni, evaluați la circa 10 000 de milioane. Denumirea celei mai mari părți a suprafeței cerebrale a mamiferelor ca *neocortex* arată că emisferele cerebrale sînt partea cea mai recent apărută, în cursul evoluției *filogenetice*, a creierului anterior. Există dovezi semnificative că neocortexul mamiferelor este consecința evoluției stratului extern care reprezintă nivelul cel mai înalt al creierului reptilelor.

De fapt, structura specială a neocortexului mamiferelor este consecința reorganizării radicale, în cursul *ontogenezei*, a celulelor nervoase din telence-

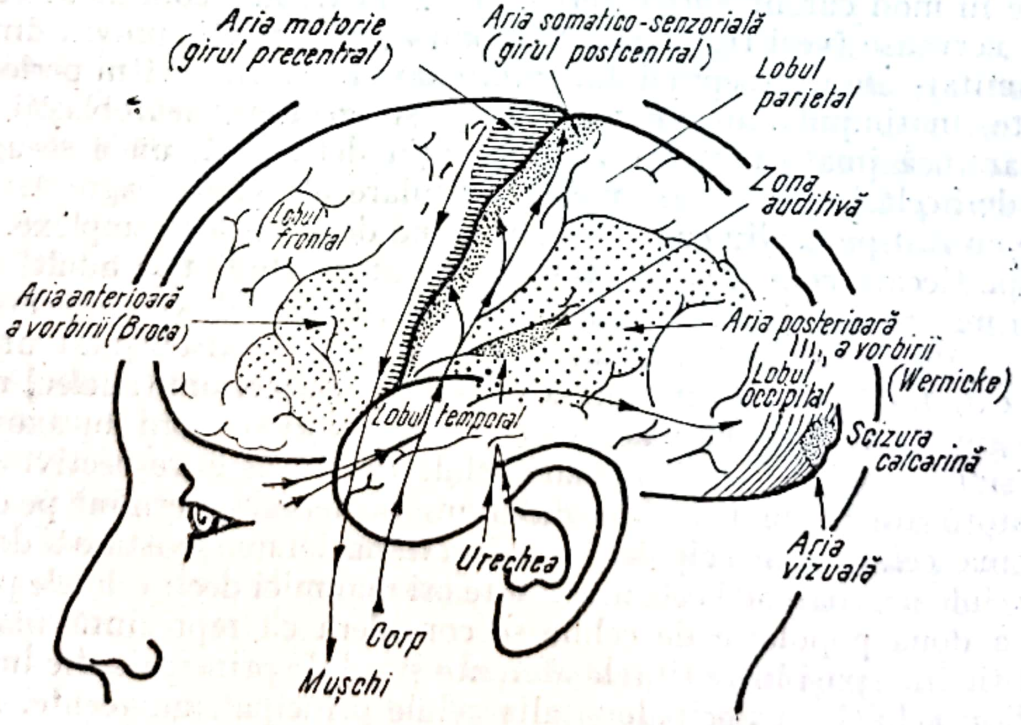


Fig. 9.51. — Schema lobilor (frontal, temporal, parietal și occipital) și a ariilor motorie, senzitivă — somatică, vizuală, auditivă și ale vorbirii (anterioară și posterioară).

Scanned with OKEN Scanner

falul fetal (vezi fig. 9.52), care au o evoluție comparabilă cu celulele striatului extern al reptilelor. Această reorganizare ontogenetică are drept consecință *structura laminată* a neocortexului mamiferelor care este suficient de tipizată. Aceeași structură microscopică generală poate fi observată în cortexul cerebral al tuturor mamiferelor, de la insectivore la primate. Astfel, s-ar putea crede că proeminența funcției mintale ar putea fi atribuită în principal cantității și nu calității cortexului uman. Dar aceasta este o eroare, pentru că așa cum o dovedesc studiile comparative sistematice, între scoarța cerebrală umană, pe de o parte, și cea a maimuțelor și a urangutanilor, pe de altă parte, există numeroase deosebiri calitative. Așa de exemplu ariile neocortexului uman prefrontal (exclusiv ariile 4 și 6) reprezintă 29% din totalul neocortexului, în timp ce acestea sînt 16,9% la cimpanzeu și 11,3% la macac. Dar exemple și mai semnificative pot fi găsite în compararea hărților întocmite pe baza citoarhitecturii neocortexului (hărțile topografice, după Brodmann) la om și primate. Astfel, o deosebire foarte evidentă o reprezintă marea extindere în neocortexul uman a ariilor 39 și 40 (care alcătuiesc o parte importantă a ariei vorbirii a lui Wernicke) și care sînt foarte mici la celelalte primate. Se poate remarca de asemenea că și marea arie 37 din lobul temporal uman nu este sesizabilă la celelalte primate. În consecință, în vreme ce ariile parietale inferioare și cele temporale superioare (care alcătuiesc aria vorbirii a lui Wérnicke) sînt foarte dezvoltate la om (fig. 9.51), ele sînt abia schițate la celelalte primate. În schimb, cortexul senzorial primar și motor ocupă arii comparativ mult mai mici la om față de restul primatelor.

9.7.3.2. Histogeneza

În primele stadii celulele neuroepiteliale ale extremității cefalice a tubului neural *se multiplică după tipul clonal*, fără a se diferenția, producînd astfel o enormă populație de celule germinale *primitive* sau celule neuroepiteliale *stem*. Proliferarea de tip clonal este succedată de un al doilea val de diviziuni, cunoscute sub denumirea de *mitoze de diferențiere*, constituind faza de

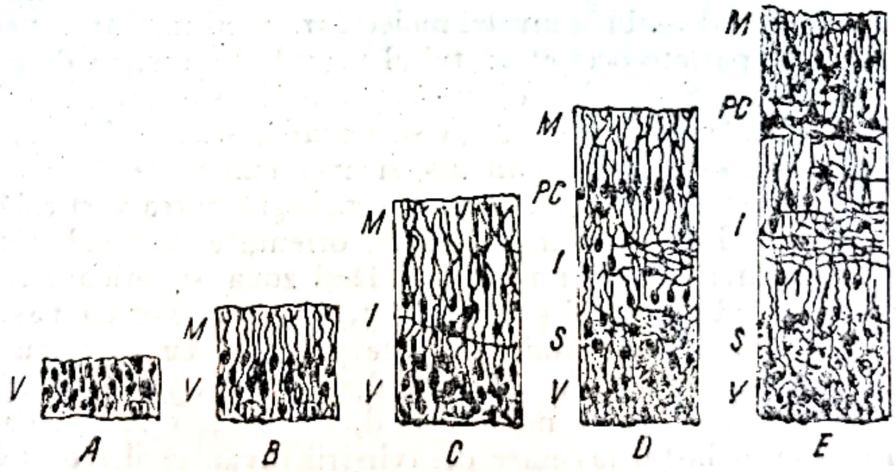


Fig. 9.52. — Schema dezvoltării zonelor embrionare principale și a plăcii corticale:
PC — placa corticală; *I* — zona intermediară; *M* — zona marginală; *S* — zona subventriculară; *V* — zona ventriculară (vezi și explicațiile din text).

Scanned with OKEN Scanner

determinare. În această a doua etapă, celulele neuroepiteliale *stem* se divid pentru a da naştere celulelor nervoase precursoare ale neuroblastelor şi respectiv ale glioblastelor. Celulele nervoase precursoare se transformă în neuroblaste sau glioblaste, care nu mai intră niciodată în diviziune, ci încep să se diferenţieze pe loc, fie migrează la locul pe care-l vor ocupa în forma definitivă, unde se diferenţiază şi apoi se maturizează. Procesul de diferenţiere şi de maturare a neuronilor implică dezvoltarea dendritelor şi axonilor. În cazul celulelor nervoase din cortexul cerebral, această ultimă fază nu se desăvîrşeşte decît tîrziu după naştere.

În figura 9.52 sînt prezentate schematic (după Sidman şi Rakič, 1973) schimbările dramatice ce se petrec în primele stadii de dezvoltare a celulelor neuroepiteliale ale extremităţii cefalice a tubului neural, schimbări care conduc la apariţia schiţei primare a neocortexului uman, adică a plăcii corticale (PC): *A* reprezintă schema tubului neural înainte de săptămîna a 6-a; *B* este perioada de 6—8 săptămîni, cînd unele celule neuroepiteliale primitive (cele din stratul V) se angajează în cel de al doilea val de mitoze (mitozele de diferenţiere), începînd să se transforme în celulele nervoase imature (adică în neuroblaste); în *C*, adică între 8 şi 10 săptămîni, neuroblastele postmitotice migrează la suprafaţă, pentru a forma stratul intermediar (I); în *D*, la 10—11 săptămîni, mitozele de diferenţiere continuă să dea naştere la noi valuri de neuroblaste postmitotice, care vor migra pentru a forma placa corticală; în *E*, la 11—12 săptămîni, celulele plăcii corticale încep să se diferenţieze (în cursul unei perioade îndelungate de timp, inclusiv după naştere), pentru a da naştere în final diferitelor straturi din structura neocortexului (vezi fig. 9.54 şi 9. 55).

În figura 9.53 (reprodusă după Rakič — *J. comp. Neurol.*, 1972, *145*, 61—84) este prezentată o secţiune transversală, desenată la camera clară, a telencefalului fetusului de maimuţă aflat în stadiu avansat de dezvoltare (a 97-a zi).

Din analiza figurii putem surprinde noi elemente ale complexului şi îndelungatului proces al etapei de diferenţiere, la capătul căruia se ajunge la constituirea structurii microscopice a scoarţei cerebrale. În acelaşi timp se poate sesiza că în prezent nu dispunem decît de un cadru general, privitor la histogeneza neocortexului şi că mai sînt încă necesare foarte ample clarificări ale mecanismelor, îndeosebi la nivelul molecular. Secţiunea transversală a fost practicată la nivel parieto-occipital: tubul neural al fetusului de maimuţă are o grosime de 4 mm. Stria albă dintre capetele de săgeată este o porţiune prezentată la o mărire mai mare (a se remarca scalele) în fig. 9.53 B, în care stratul extern este orientat în sus, şi un segment de 2 500 μm din mijloc este omis. Această ultimă figură ilustrează organizarea verticală a cortexului imatur în care lungi prelungiri gliale, orientate vertical, servesc drept ghid pentru migrarea celulelor nervoase. Deşi zona superioară a cortexului, care cuprinde stratul marginal şi placa corticală (care vor da naştere neocortexului printr-un proces de laminare), este populată cu un imens număr de neuroni, în straturile profunde (în stratul ventricular) se mai găsesc celule germinative aflate în faza de mitoze de diferenţiere, care vor da naştere la noi valuri de neuroblaste, necesare desăvîrşirii organizării scoarţei cerebrale.

La naştere, copilul are un organism cu posibilităţi de adaptare extrem de limitate. El posedă însă o mare capacitate de dezvoltare şi de supravieţuire dacă este supravegheat şi hrănit corespunzător. Creierul său se află

Scanned with OKEN Scanner

la un înalt grad de dezvoltare, însumînd aproape totalitatea neuronilor din organismul adult. Cu toate acestea, complexitatea legăturilor interneuronale este departe de forma lor de dezvoltare completă și acestea se vor realiza pe tot parcursul creșterii, pînă la stadiul adult.

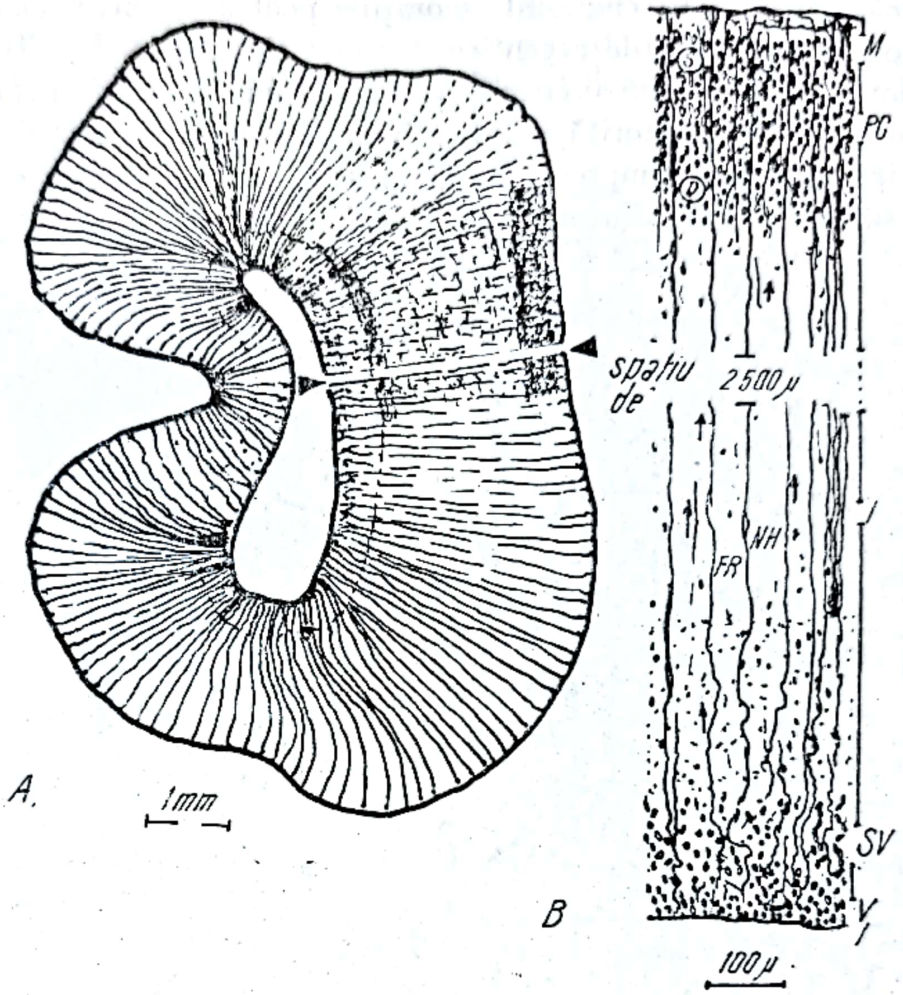


Fig. 9. 53. — Desenul efectuat la camera lucidă al unei secțiuni transversale prin telencefalul de fetus de maimuță din ziua a 97-a:
A — la nivelul parieto-occipital. Stria albă delimitată de capetele săgeților este prezentată mărită în schema *B* (de remarcat scalele). Porțiunea din mijlocul figurii de 2 500 μm, este omisă. Literele de pe margine indică zonele ca în fig. 9.52; *S* — celule corticale superficiale; *D* — celule corticale profunde; *NM* — neuroblaști migratori; *FR* — fibre radiare gliale.

9.7.3.3. Structura microscopică a scoarței cerebrale

Prin colorația cu hematoxilină-eozină se disting următoarele elemente: *a*) corpul celulelor piramidale mari; *b*) nucleii neuronilor mici sau ai nevrogliilor; *c*) capilarele sanguine și *d*) neuropilul care apare ca o țesătură fină, relativ bine colorabilă, care formează structura intercelulară. De asemenea substanța cenușie se deosebește cu oarecare dificultate de substanța albă, care este așezată sub scoarță. Pentru a face deosebirea între scoarță și substanța

Scanned with OKEN Scanner

albă trebuie remarcat mai întîi că aceasta din urmă apare mai strălucitoare, mai bogată în nuclei de mărimi aproximativ egale și, în sfîrșit, că în jurul nucleilor (care sînt exclusiv nuclei nevroglici) nu se remarcă citoplasmă.

Neuronii din scoarța cerebrală sînt atît de strîns împachetați încît caracterele lor morfologice individuale nu pot fi recunoscute decît prin colorații histologice speciale, cum sînt colorațiile pentru corpii Nissl (fig. 9.54) sau, îndeosebi, impregnările argentice de tip Golgi (fig. 9.55). Totuși, prin aceste colorații speciale numai circa 1% din neuroni sînt colorați și mai multe unități pot fi sesizate datorită ramificațiilor dendritice sau axonice (puse în evidență în special prin impregnarea argentică), care sînt dirijate oblic față de soma sau de corpul neuronal.

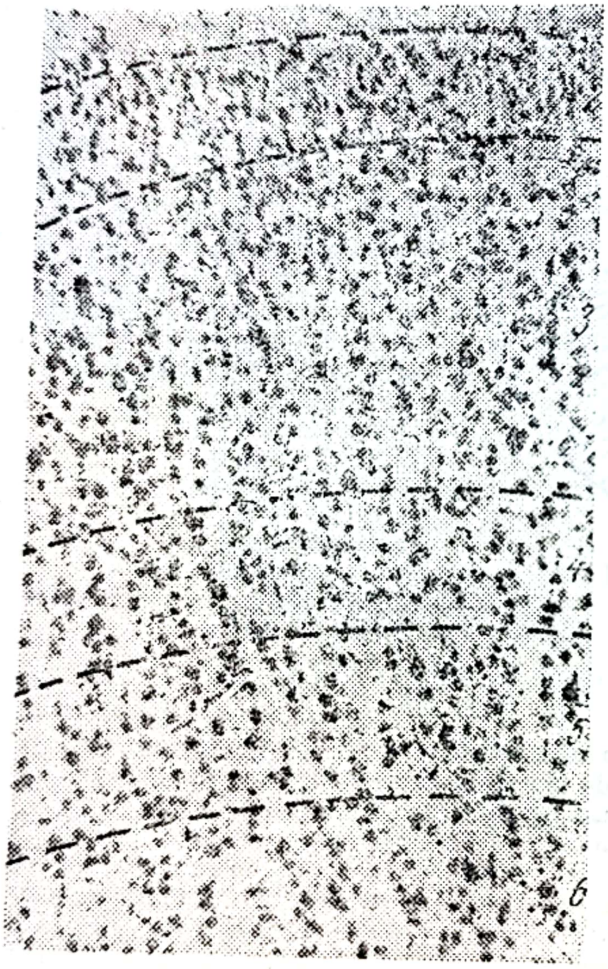


Fig. 9. 54. — Imagine microscopică a unei secțiuni în scoarța creierului mare, colorată cu albastru de toluidină. Este de remarcat că limitele dintre cele 6 straturi nu sînt foarte nete. Citoplasma neuronilor este intens colorată. Se poate observa traiectul capilarelor sanguine, datorită nucleilor foarte mici ai celulelor nevroglice care participă la formarea barierelor hematoencefalice.

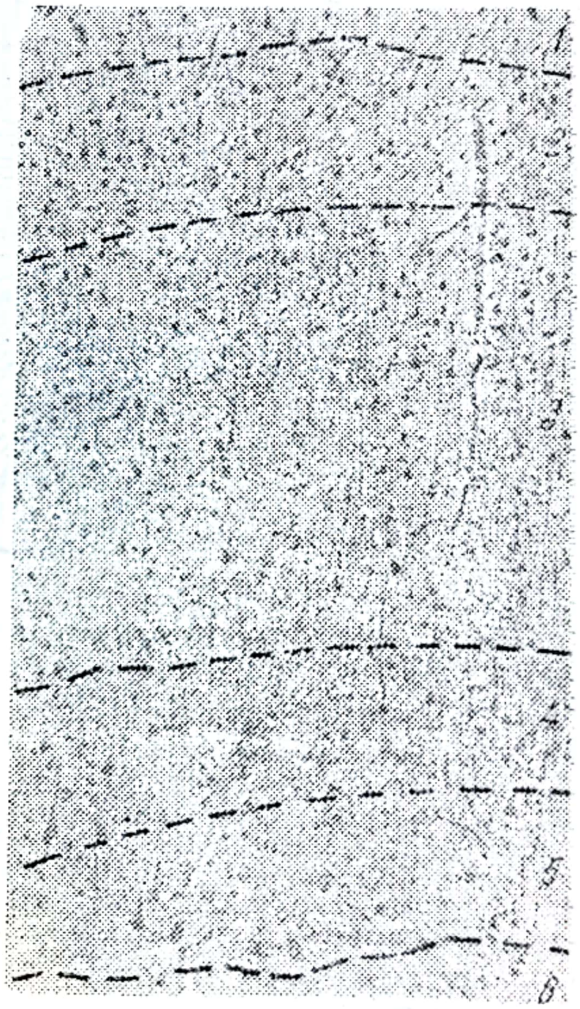


Fig. 9. 55. — Imaginea microscopică a unei secțiuni în scoarța creierului mare de om, impregnată argentic: se pot distinge bine celulele piramidale în stratul granular extern (micile celule piramidale), în stratul paranodal extern (celule piramidale mijlocii) și în stratul paranodal intern (marile celule de tip Betz sau celulele ganglionare). În consecință, secțiunea este prin zona motorie a scoarței cerebrale. De remarcat traiectul unui vas care se ramifică perpendicular.

Scanned with OKEN Scanner

9.7.3.3.1. Organizarea laminară

Organizarea laminară este principiul care se află la baza dispoziției neuronilor și fibrelor nervoase din neocortex. În conformitate cu acest principiu, în alcătuirea scoarței cerebrale pot fi distinse șase straturi, numerotate cu cifre romane de la exterior spre interior (spre substanța albă). Trebuie remarcat de la început că straturile nu sînt net delimitate, ele putînd fi distinse mai degrabă pe baza predominanței unor tipuri de celule sau a aranjării unor fibre (vezi fig. 9.54 și 9.55 și fig. 9.56). Straturile care alcătuiesc neocortexul

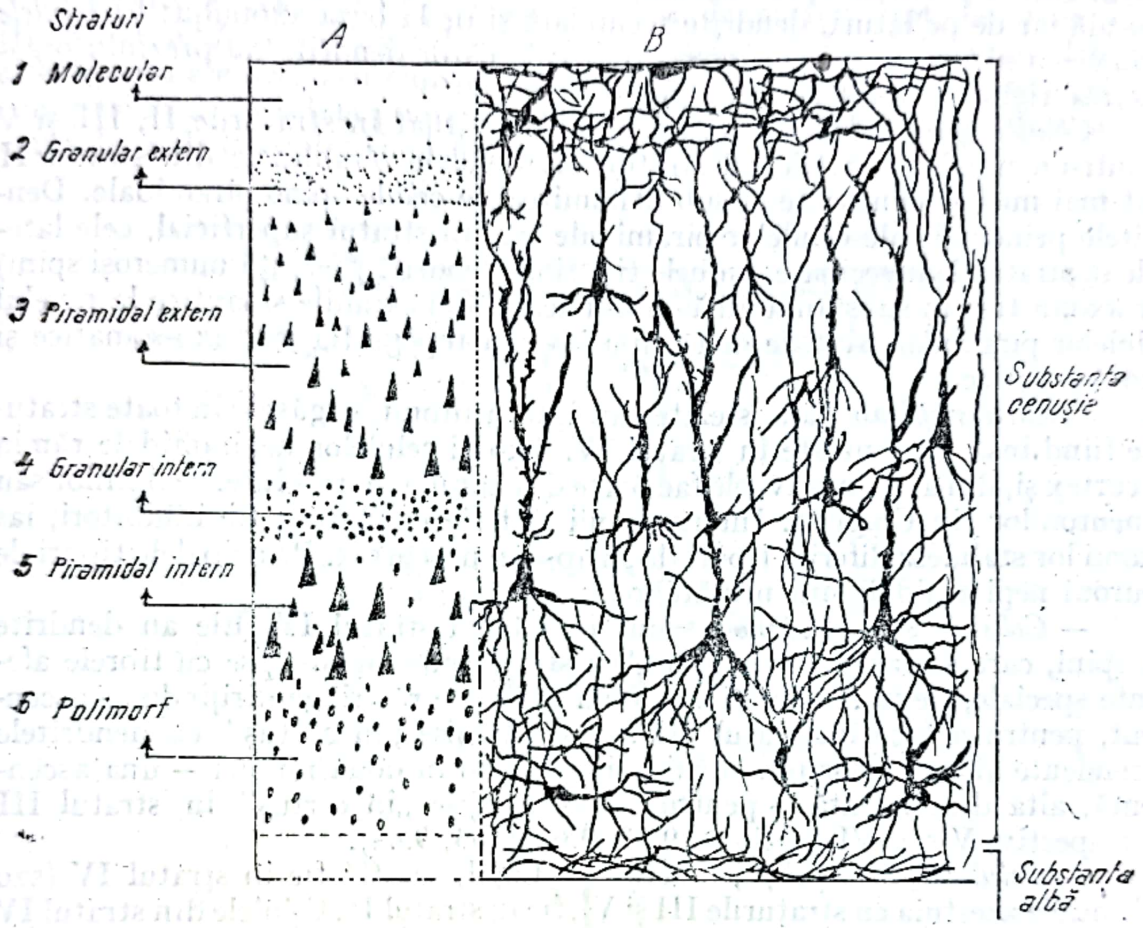


Fig. 9. 56. — Schema scoarței cerebrale:
A — după coloratia cu HE; *B* — după impregnația argentică.

sînt: I. *Stratul molecular sau plexiform* [*lamina molecularis (plexiformis)*] care constă, în principal, din fibre amielinice, cele mai multe orientate paralel cu suprafața și relativ puține celule — celulele orizontale Cajal; II. *stratul granular extern (lamina granularis externa)* care constă din numeroase celule mici, cele mai multe de formă piramidală sau piramidal-stelată, aspect care justifică denumirea de stratul micilor celule piramidale; III. *stratul piramidal extern* sau al celulelor piramidale mijlocii *(lamina pyramidalis externa)*; IV. *stratul granular intern (lamina granularis interna)* caracterizat prin prezența a numeroase celule mici, stelate (celule stelate cu spini, celule nevrogliforme etc.); *stratul piramidal intern (lamina pyramidalis interna)* sau stratul marilor celule piramidale sau stratul ganglionar, care în zona motorie precentrală

Scanned with OKEN Scanner

conține celule piramidale foarte mari, denumite celule Betz, iar în alte zone conține celule piramidale mai mici decît stratul al III-lea; VI. *stratul polimorf (lamina multiformis)* care conține celule de forme diferite, printre care celulele fuziforme și celulele Martinotti (acestea din urmă trimit axoni spre suprafață, în direcția opusă celulelor piramidale).

Trebuie precizat că practic în fiecare strat există mai multe tipuri de neuroni; cu toate acestea, din motive euristice* s-a convenit ca celulele nervoase din neocortex să fie încadrate în două clase: *a) celulele piramidale*, denumite astfel pentru forma corpului lor, care seamănă cu o piramidă din vîrful căreia pornește spre suprafață o dendrită principală, ascendentă sau apicală iar de pe laturi, dendrite secundare și de la baza axonului; *b) celulele stelate* sau *nepiramidale* sau *interneuroni*, ale căror dendrite nu prezintă organizarea rigidă a celulelor piramidale.

Celulele piramidale au corpul de obicei situat în straturile II, III și V și într-un număr mai mic, în stratul VI. Celulele piramidale din stratul II sînt mai mici și cunoscute și sub denumirea de celule spino-piramidale. Dendritele principale ale celulelor piramidale trec în stratul superficial, cele laterale în straturile învecinate (ambele tipuri de dendrite prezintă numeroși spini) iar axonii trec în substanța albă subcorticală. Conexiunile sinaptice la nivelul celulelor piramidale sînt de două tipuri, după topografia lor: axo-somatice și axo-dendritice.

Celulele nepiramidale, stelate sau interneuronii, se găsesc în toate straturile fiind însă concentrate în stratul IV. Axonii celulelor nepiramidale rămîn în cortex și, din acest motiv, ele fac parte din familia mare a interneuronilor sau a neuronilor tip Golgi II. Interneuronii sînt fie excitatori, fie inhibitori, iar axonii lor stabilesc diferite tipuri de sinapse în neocortex. Principalele tipuri de neuroni nepiramidali sînt următoarele:

— *Celulele stelate spinoase* sînt plasate în stratul IV. Ele au dendrite cu spini, care se ramifică fie în același strat, unde fac sinapse cu fibrele aferente speciale, fie în stratul III. Axonul lor fie se răsfrînge dirijîndu-se ascendent, pentru a face în stratul III sau II sinapse „în cartuș" cu dendritele ascendente ale celulelor piramidale, fie se divid în două ramuri — una ascendentă, alta descendentă — pentru a face sinapse „în cartuș" în stratul III și, respectiv, V sau VI (vezi fig. 9.59, 9.61, 9.63, 9.64).

— *Celulele „în coșuleț"*, descrise de Cajal, se află fie în stratul IV (sau la limitele acestuia cu straturile III și V), fie în stratul II. Celulele din stratul IV fac sinapse axo-somatice cu corpul celulelor piramidale din straturile V sau III; axonul celor din stratul II face sinapse cu corpul celulelor spino-piramidale din stratul respectiv (vezi fig. 9.63). Sinapsele acestor celule cu celulele piramidale sînt de tip inhibitor (vezi fig. 9.59).

— *Celule cu buchet dublu (cellules à double bouquet*, după R.Y. Cajal) se află în straturile II, III sau IV. Aceste celule trimit axoni, care, după ce se divid în ramuri ascendente și descendente, dau naștere unor lungi sinapse verticale duble în formă de „coadă de cal" (vezi fig. 9.62).

— *Celulele nevrogliforme* sînt în stratul IV, dau ramificații dendritice în același strat (care fac sinapse cu fibrele aferente speciale) iar axonii lor coboară în stratul VI pentru a face sinapse cu celulele Martinotti (vezi fig. 9.62, 9.63).

---

* Euristic — ceea ce este folositor (semnificativ) într-un anumit stadiu al cunoașterii, pentru cunoașterea ulterioară.

Scanned with OKEN Scanner

— *Celulele „în candelabru"* se află în stratul II iar axonii lor fac sinapse inhibitorii cu dendritele principale ale celulelor piramidale (vezi fig. 9.64).

— *Celulele Martinotti* au corpul plasat în stratul VI și trimit un axon ascendent lung, care ajunge în stratul molecular, unde se divide în „T" contribuind la organizarea fibrelor paralele din acest strat, alături de fibrele aferente calosale și de cele de asociație (vezi fig. 9.63).

În stratul II se mai află *celule stelate* mici ai căror axoni fac *sinapse inhibitorii de tip axo-axonic* cu celulele piramidale din straturile superioare (vezi fig. 9.63)

Fibrele aferente principale care sosesc la cortex sînt de trei feluri (fig. 9.57): *a) fibrele aferente de asociație* care provin de la celule piramidale din alte regiuni ale aceleiași emisfere (fibre ipsilaterale); *b) fibre aferente calosale* care provin de la celule piramidale din emisfera opusă (sau fibre de asociație controlaterale calosale) și *c) fibre aferente speciale* sau senzoriale.

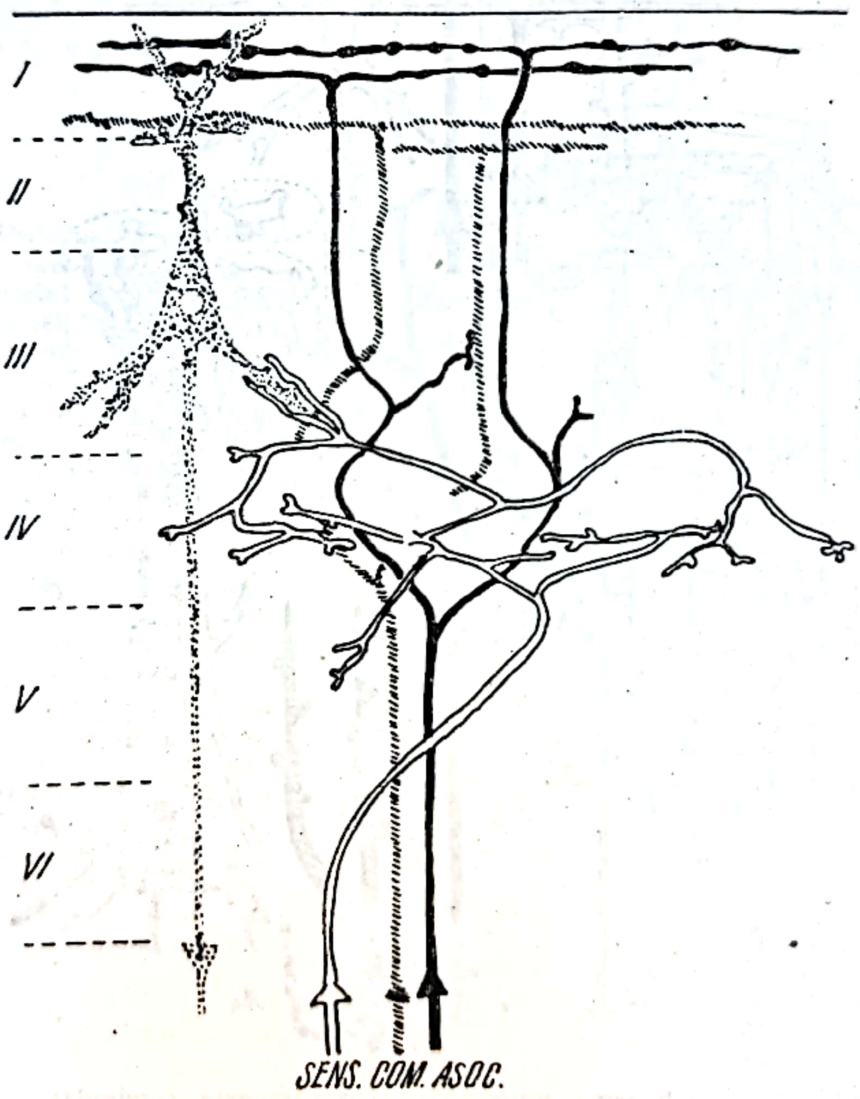


Fig. 9. 57. — Schema distribuției în scoarța cerebrală a principalelor fibre aferente:
SENS — fibrele aferente speciale senzoriale; *COM* — fibrele aferente comisurale; *ASOC* — fibrele aferente de asociație ipsilaterale (pentru detalii vezi textul).

Scanned with OKEN Scanner

Din figurile 9.57 și 9.58 se poate vedea că fibrele aferente *speciale* fac sinapse în stratul IV cu celulele nepiramidale spino-stelate sau cu celulele nevrogliforme, precum și cu dendritele celulelor piramidale. Fibrele aferente de asociație și cele comisurale se termină îndeosebi în straturile superficiale, sub formă de fibre paralele; fibrele de asociație ajung net în primul strat iar fibrele calosale, la limita dintre primul și al doilea strat. Aferențele de asociație și cele comisurale formează sinapse cu ramificațiile terminale ale dendritelor apicale ale celulelor piramidale.

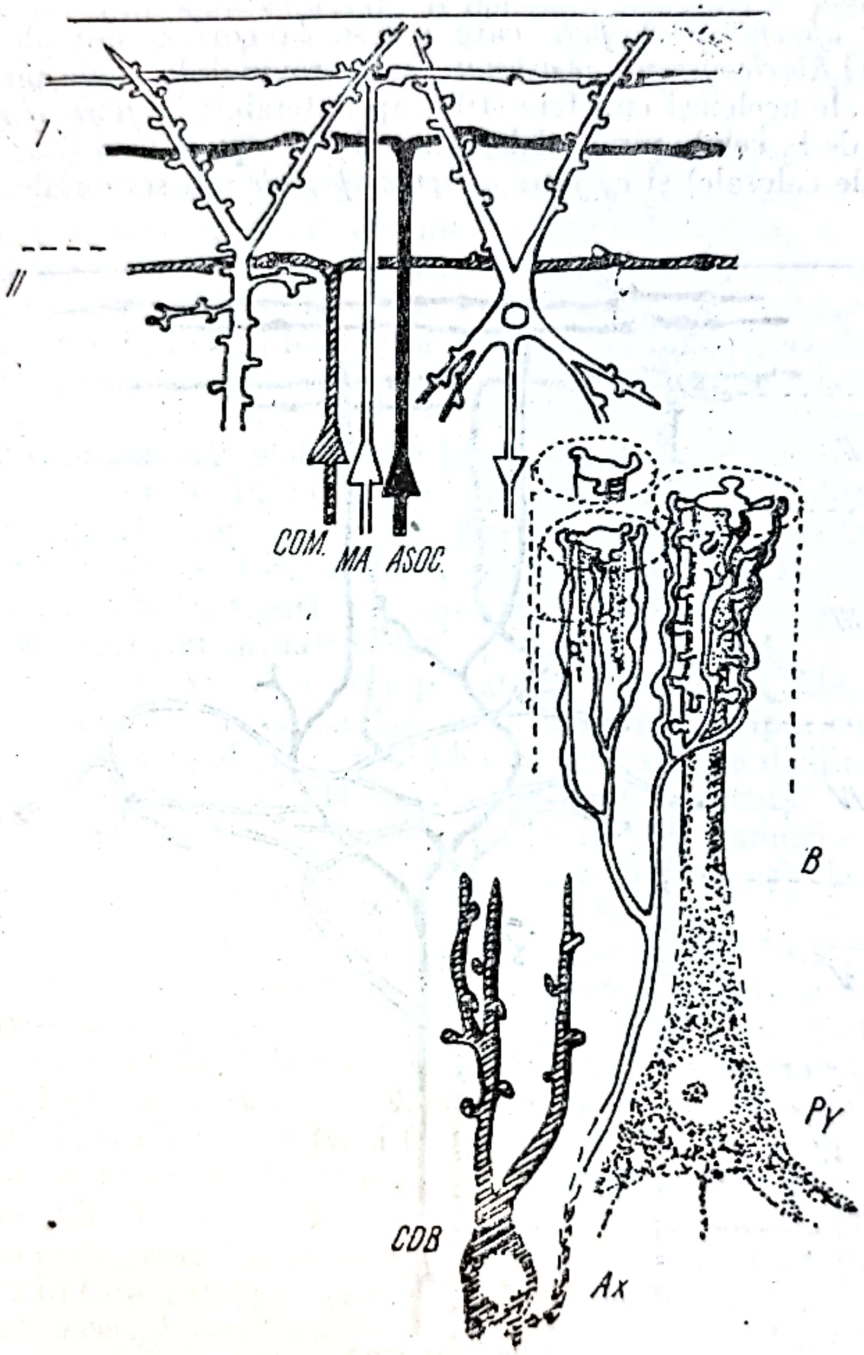


Fig. 9. 58. — Schema unor sinapse din scoarța cerebrală: *A* — sinapsele din straturile I și II ale fibrelor aferente, paralele *(COM* — comisurale; *ASOC* — asociație; *MA* — axonii celulelor Martinotti) cu dendritele celulelor piramidale; *B* — sinapsele speciale, „în cartuș", formate de axonii *(Ax)* celulelor cu dublu buchet *(CDB)* în jurul dendritei apicale principale a celulei piramidale *(Py)*.

Scanned with OKEN Scanner

Asupra caracteristicilor circuitelor nervoase din laminele neocortexului

Din analiza schemelor prezentate în fig. 9.57—9.59 se pot remarca două caractere majore ale sinapselor corticale: *a)* se extind în mai multe planuri orizontale și *b)* sinapsele verticale au proprietăți cu totul speciale.

a) Principalele straturi în care sinapsele se extind *în plan orizontal* sînt straturile I, II și IV. Caracterul acestor sinapse este fie axo-dendritic, fie axo-somatic (fig. 9.58 și 9.59).

Examenul atent al fig. 9.58 A ne permite să surprindem *două caracteristici ale sinapselor axo-dendritice din straturile I și II.* În primul rînd trebuie observat că fibrele paralele (rezultate din ramificarea în „T" a axonilor de asociație, a axonilor comisurali și a axonilor Martinotti) formează sinapse „de încrucișare" cu dendritele celulelor spino-piramidale. Ținînd seama că în cursul încrucișării o dendrită și un axon nu pot stabili decît un singur buton sinaptic (cel mult două), aceasta are drept consecință faptul că dendritele unei singure celule spino-piramidale pot stabili sinapse încrucișate de aspect punctiform cu mii de fibre paralele deferite (sau că o singură fibră paralelă, care se extinde 3—5 mm, formează sinapse încrucișate cu cîteva

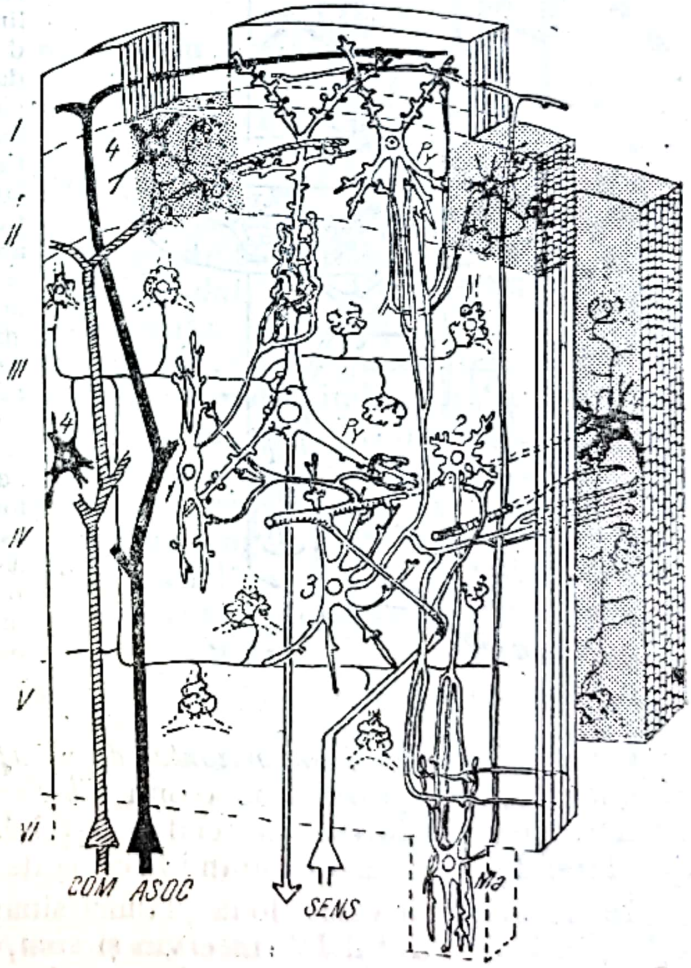


Fig. 9.59. — Principalele circuite din neocortex: aferențele comisurale *(COM)*, aferențele de asociație *(ASOC)* și axonii celulelor Martinotti *(Ma)* formează fibrele paralele care fac sinapse cu dendritele neuronilor piramidali în stratul I și II. Aferențele speciale senzoriale *(SENS)* formează sinapse în stratul IV cu dendritele celulelor spino-stelate *(3)*, nevrogliforme *(2)*, „în coșuleț" *(4)*, cu cele piramidale *(Py* dendritele laterale), precum și cu dendritele celulelor cu „dublu buchet" *(1)*. Axonii celulelor „în coșuleț" *(4)* din stratul IV formează sinapse axo-somatice cu celulele piramidale din stratul III și V iar axonii celulelor „în coșuleț" din stratul II, cu corpul celulelor spino-piramidale din același strat. Axonii celulelor cu dublu buchet *(1)*, ca și ai unor celule spinos-stelate (nefigurate în schemă) fac sinapse, „în cartuș" cu dendrita principală a celulelor piramidale.

mii de celule spino-piramidale). Cea de a doua caracteristică este faptul că fibrele paralele au trei origini și că ele se concentrează în trei planuri diferite: aferențele de asociație ocupă planul cel mai extern; aferențele comisurale ocupă planul cel mai intern; axonii Martinotti (care se află în aceeași coloană

Scanned with OKEN Scanner

de substanță cenușie) se plasează în plan intermediar. Cu alte cuvinte, fibrele paralele din straturile I și II formează un sistem de plase fine, concentrice, care sînt țesute strîns prin intermediul a nenumărate sinapse punctiforme axo-dendritice de către celulele spino-piramidale. Este evident că funcționarea unui atare sistem sinaptic se bazează pe convergența impulsurilor sosite simultan în lungul mai multor axoni. Datorită numărului enorm de aferențe axonice și numărului încă și mai mare de sinapse de încrucișare, plinzele sinaptice din straturile I și II reprezintă dispozitive de ecranare capabile să modeleze intensitatea stimulilor primiți cu o suplețe inimaginabilă.

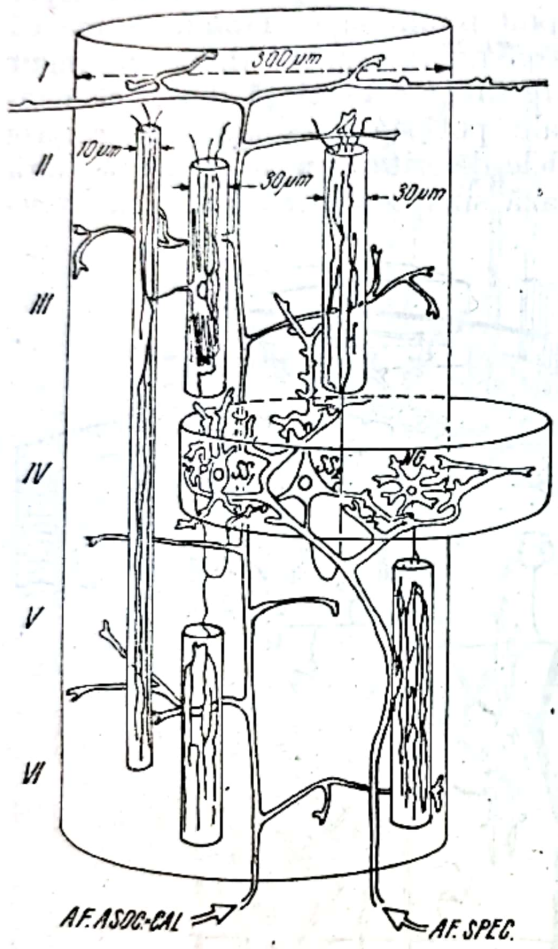


Fig. 9.60. — Distribuția modulară a conexiunilor excitatorii aferente și a interneuronilor considerați a fi excitatori. Cilindrul al cărui diametru este de 300 μm corespunde spațiului terminațiilor aferențelor cortico-corticale (de asociație sau ipsilaterale și calosale sau controlaterale), cu excepția stratului I, unde ramificațiile orizontale ale ramurilor terminale sînt mult mai lungi decît limitele cilindrului. Cilindrul turtit din dreapta (are același diametru ca primul dar se suprapune doar parțial pe acesta) corespunde spațiului terminațiilor fibrelor aferente specifice *(AF, SPEC)*. Sînt figurate două tipuri de celule spino-stelate care sînt celule-țintă monosinaptice pentru aferențele specifice: SS_1 are o ramificație ascendentă și alta descendentă a axonului său iar SS_2 are doar un axon ascendent. Celula nevrogliformă *(NG)* are un axon descendent. Axonii celulelor spino-stelate și ai celulei nevrogliforme formează sinapse complexe „în cartuș", cu diametrul de 30 μm. Este de asemenea indicată o celulă cu „dublu buchet" (CDB) al cărei axon formează un complex sinaptic avînd aspect de „coadă de cal" și diametrul de 10 μm. Schema sugerează că celulele piramidale dispun de o mare gamă de impulsuri excitatorii care sînt recepționate de dendritele lor apicale sau de cele colaterale.

Cel de al doilea *plan orizontal de sinapse axo-dendritice* se află plasat în *stratul IV* și este realizat de axonii *fibrelor aferente speciale*, pe de o parte, cu dendritele celulelor spino-stelate, al celulelor nevrogliforme sau cu dendritele laterale ale celulelor piramidale, pe de altă parte (vezi fig. 9.57).

În desăvîrșirea celor două planuri sinaptice orizontale (cel din stratul I și II și cel din stratul IV) intervin și *sinapse axo-somatice*, reprezentate de axonii celulelor „în coșuleț" și de corpul celulelor piramidale (fig. 9.59 și vezi fig. 9.64). Așa cum arătam, acestea sînt sinapse de tip inhibitor.

b) În figura 9.60 se poate observa că mai multe tipuri de neuroni intermediari (celulele spino-stelate și celulele nevrogliforme din stratul IV, celulele cu buchet dublu) formează *sinapse speciale*, alungite vertical în formă de

Scanned with OKEN Scanner

„cartuș" sau în formă de „coadă de cal" cu diametrul mic fie de 30 μm, fie de 10 μm și cu lungime variabilă. Caracteristica esențială a acestor sinapse (așa cum reiese din fig. 9.58 B) este aceea că axonul înlănțuiește dendrita unei singure celule piramidale sau face sinapsă cu alte celule intermediare, stabilind cu aceasta cîteva sute de contacte sinaptice. În consecință, sinapsele speciale („în cartuș" sau „în coadă de cal") sînt alcătuite ca dispozitive complexe avînd o singură celulă-țintă. Astfel, efectul acestor sinapse este foarte puternic asupra neuronului-țintă și, prin aceasta, se deosebește radical de mecanismul de acțiune al sinapselor realizate de fibrele paralele din stratul I și II.

Principalele circuite neuronale din neocortex sînt prezentate schematic în fig. 9.59. În esență, circuitele neuronale realizează, pe de o parte, o rețea tridimensională extrem de complexă iar pe de altă parte, în alcătuirea sa sînt implicate atît sinapse simple de slabă energie (organizate în pînze, în care impulsul acționează convergent asupra mai multor celule) cît și dispozitive sinaptice complexe de înaltă energie (care acționează asupra unei singure celule-țintă).

9.7.3.3.2. Organizarea modulară

Un al doilea principiu important (bazat pe studiile recente privitoare la ariile senzoriale ale cortexului cerebral) este organizarea celulelor *în coloane sau în plăci verticale* (denumite generic „module"), perpendiculare pe suprafața neocortexului, care traversează toate straturile. În fiecare coloană, toate celulele par să fie subordonate unei variante senzoriale sau unei comportări particulare față de stimulul senzorial. Așadar, în cortexul somatosenzorial, celulele dintr-o coloană pot răspunde toate, de exemplu, la mișcarea unei anumite articulații, în timp ce în altă coloană, pot răspunde toate, de exemplu, la stimulii tactili ușori, primiți de la piele. În mod similar, în cortexul vizual, celulele dintr-o placă vor răspunde preferențial stimulilor primiți de la ochiul drept, în vreme ce cele din placa vecină vor răspunde stimulilor veniți de la ochiul stîng. De asemenea, în aceeași „coloană oculară dominantă" toate celulele dintr-o singură coloană verticală îngustă pot răspunde numai stimulului vizual privitor la orientarea spațială specială. În cazul cortexului motor, toate celulele dintr-o coloană sînt conectate la același grup de neuroni motori spinali.

Definirea modulului prin fibrele de asociație și fibrele calosale. În figura 9.61 este prezentat schematic, după Szentàgothài (1978), felul în care imensa lamă a neocortexului este subdivizată într-un „mozaic de unități spațiale semidiscrete". Acestea sînt considerate elementele morfologice de bază în planul funcțional al neocortexului. În partea stîngă a figurii 9.61 sînt marcate celulele piramidale strîns împachetate într-un asemenea modul sau coloană, care are un diametru de circa 250 μm. Axonii acestor celule piramidale sînt proiectați la trei alți moduli din aceeași emisferă și, după ce traversează corpul calos, la alți doi moduli din emisfera opusă. Astfel în schemă sînt prezentate simplificat proiecțiile de asociație și cele calosale ale celulelor piramidale dintr-un modul.

Pentru a pătrunde mai adînc în înțelegerea felului în care operează mașinăria neuronală din moduli, trebuie reținut că figura 9.61 este foarte

Scanned with OKEN Scanner

simplificatoare. Mai întîi trebuie precizat că un modul de 250 μm este alcătuit din circa 2 500 de neuroni, din care cel puțin 1 000 sînt celule piramidale. Fiecare modul cuprinde circa 50 de celule piramidale care emit fibre calosale (care vor intra în cele 200 milioane ce compun corpul calos) și circa 500 de celule piramidale care emit fibre de asociație destinate modulilor ipsilaterali.

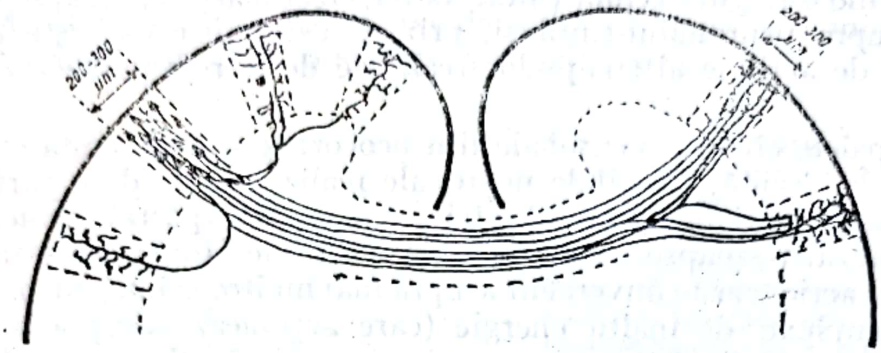


Fig. 9. 61. — Schema legăturilor cortico-corticale din creier (circumvoluțiile sînt omise): conexiunile se realizează pe căi foarte specifice, între coloane (moduli) verticale cu diametrul de 200—300 μm, plasate în ambele emisefere. Conexiunile ipsilaterale provin îndeosebi de la celulele piramidale localizate în stratul III (celulele clare, prezentate în modulul din stînga), în timp ce conexiunile controlaterale (celulele complet negre) provin din toate straturile, de la II la VI.

Dar și această precizare a numărului de fibre calosale și de asociație care pornesc de la și vin la un modul, nu este suficientă. Este necesar să adăugăm că aceste fibre sînt activate într-un singur moment și că dacă modulul respectiv este excitat, în cîteva milisecunde sînt excitați alți moduli secundari (cu care se află conectat modulul ce a primit excitația primară). Modulii secundari, la rîndul lor, propagă extrem de rapid excitația la un număr și mai mare de moduli terțiari iar aceștia, la moduli cuaternari și așa mai departe, la întreaga scoarță cerebrală. Neocortexul uman este alcătuit din aproximativ 4 milioane de moduli și astfel dispune de imense posibilități pentru a elabora scheme spațio-temporale, chiar și în ipoteza că excitația primară pornește de la un singur modul.

Fibrele aferente specifice din talamus. În continuare vom urmări circuitele interneuronale, luînd ca exemplu cazul aferentelor specifice (talamice) ale unor sisteme senzoriale, pentru că acestea sînt cel mai bine studiate. În figura 9.62 este prezentată, după Szentàgothài (1978), o schemă foarte simplificată a ramificațiilor pe care le formează aferențele specifice în stratul IV, pentru a stabili contacte sinaptice la baza dendritelor celulelor piramidale și pe spinii celulelor stelate. Celulele spino-stelate (Sst) formează, la rîndul lor, un tip special de sinapse puternic excitatorii pe dendritele apicale a două celule piramidale, care sînt cunoscute sub denumirea de sinapse „în cartuș". De asemenea, în negru sînt ilustrați neuronii inhibitori care vor fi prezentați mai amănunțit în figurile următoare. În figura 9,62 este ilustrată ramificația amplă a fibrelor aferente specifice în stratul IV, destinată sinapselor excitatorii și nu sînt detaliate sinapsele cu interneuronii inhibitori.

În figura 9.60 sînt reprezentate în paralel două tipuri de fibre aferente care sosesc la neocortex. Mai întîi sînt figurate *aferențele de asociație și*

Scanned with OKEN Scanner

calosale (schematizate și în figura 9.57) ce se ramifică în toate straturile, cu excepția stratului IV, făcînd numeroase sinapse în modulul respectiv. În final, aceste aferențe se bifurcă în stratul I, pentru a forma fibrele paralele care se extind orizontal circa 3 mm în fiecare direcție, stabilind contacte cu ramificațiile apicale a numeroase celule piramidale. Spre deosebire de acestea, *aferențele speciale* se ramifică amplu în stratul IV, formînd sinapse excitatorii pe celulele spino-stelate SS2 care formează, la rîndul lor, „cartușe" în diametru de 30 μm ce vor înfășura dendritele apicale ale celulelor piramidale (vezi fig. 9.58 B și 9.62). În plus, aferențele speciale excită alți neuroni spino-stelați, SS1, care excită la rîndul lor, de asemenea printr-un fel de „cartuș", o celulă cu „buchet dublu" ce dă naștere unui nou dispozitiv sinaptic în formă de „dublă coadă de cal", cu un diametru de 10 μm. O altă celulă, de tip nevrogliform (NG) dă naștere unui dispozitiv sinaptic descendent. Figura 9.60 are drept scop să arate că *sinapsele fibrelor aferente speciale* sînt localizate într-un disc din stratul IV, însă prin următoarea legătură sinaptică a impulsului aferențelor speciale, acesta este transformat într-o acțiune excitatorie puternică, în formă de coloană sau de modul, care se extinde drept peste straturi, cu excepția stratului I. Deci trebuie să considerăm modulul ca fiind destinat să amplifice un impuls excitator. În același timp din figura 9.60 rezultă că discul aferentelor speciale din *lamina* IV nu se încadrează exact în coloana aferențelor de asociație și comisurale.

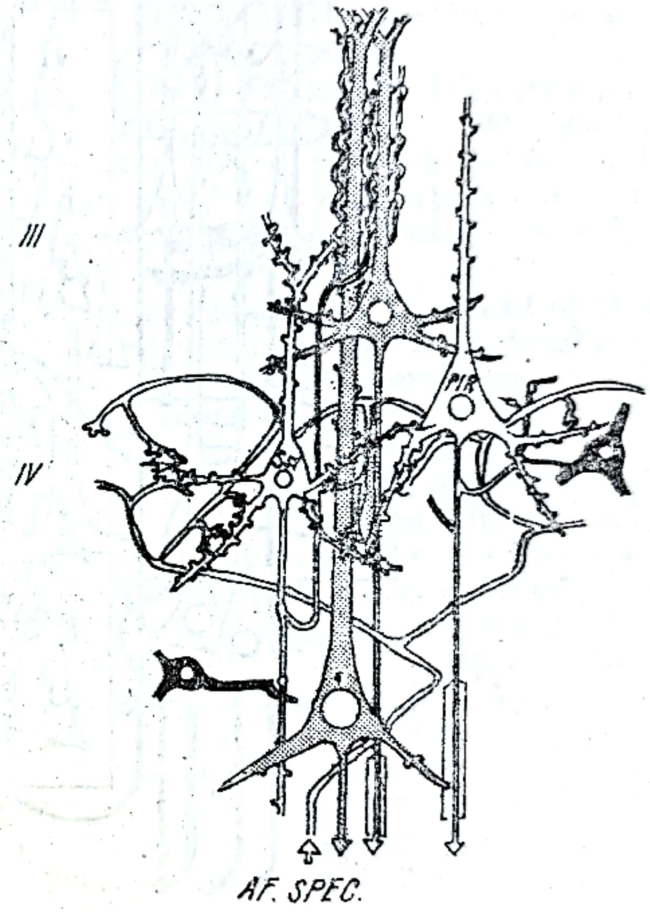


Fig. 9. 62. — Circuitele directe neuronale excitatorii ale fibrelor aferente specifice sau senzoriale *(AF. SPC.)*. Aceste aferențe formează monosinapse atît cu dendritele celulelor spino-stelate *(SST)* cît și cu dendritele laterale ale celulelor piramidale *(Pir)*. Neuronii inhibitori (în negru) pot face sinapse cu axonii colaterali ai celulel9r stelate sau piramidale. Dendritele apicale ale celulelor piramidale din straturile III și V (în cenușiu) formează sinapse complexe „în cartuș" cu axonii celulelor spino-stelate sau ai celulelor cu „dublu buchet".

Inhibiția corticală. Conexiunile care conferă caracterul modular cvasidiscretelor unități spațiale sînt reprezentate de sinapsele excitatorii. Acestea

Scanned with OKEN Scanner

pot fi induse fie de impulsurile primare sosite la unitățile corticale respective, așa cum este cazul ca modulele de asociație și calosale (fig. 9.61), fie de acțiunile excitatorii secundare sau terțiare, reprezentate de impulsurile aferente specifice (fig. 9.63). O influență adițională importantă este exercitată de

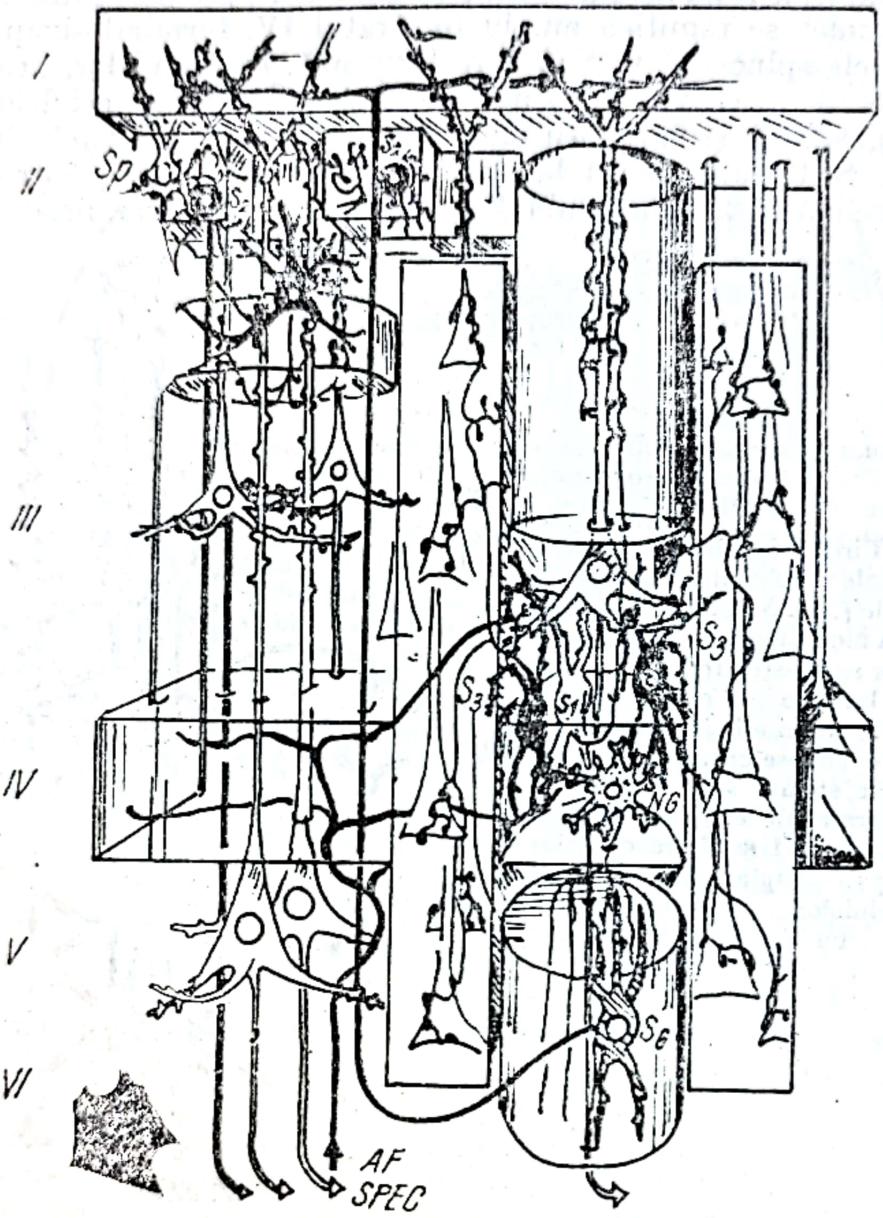


Fig. 9. 63. — Schema tridimensională a principalelor tipuri de neuroni corticali și a terminațiilor fibrelor aferente specifice *(AF. SPEC)* ca în fig. 9.62. Sînt prezentate mai evident două celule piramidale în stratul V (în stînga figurii) și trei în stratul III, dintre care cea din dreapta într-o coloană detaliată. În această coloană sînt două celule inhibitorii (S_3) al căror axon formează sinapse „în coșuleț" pe corpul celulelor piramidale (schițate vag) din două plăci adiacente. În extremitatea stîngă a stratului II se văd două celule stelato-piramidale *(Sp)* și două celule stelate (S_2) inhibitorii, întunecate. În stratul IV se află o celulă stelată spinoasă (S_1) al cărui axon face sinapsă „în cartuș" cu celula piramidală din stratul III. Sub celula S_1 se află o celulă nevrogliformă *(NG)* al cărei axon face sinapsă cu dendritele celulei Martinotti (S_6). Axonul acesteia ajunge în stratul *I*.

Scanned with OKEN Scanner

interneuronii inhibitori, care intervin pentru a limita acțiunea sinaptică excitatorie. O parte din acești interneuroni sînt destinați celulelor piramidale de la nivelul modulilor adiacenți; în consecință, ei vor avea o acțiune sculpturală, tinzînd să accentueze suprafețele care delimitează modulii. O altă parte dintre interneuronii inhibitori au o influență discriminatorie fină în interiorul modulului. De exemplu, în figura 9.63, axonii celor doi neuroni inhibitori marcați S3 formează sinapse „în coșuleț" pe corpul celulelor piramidale din stratul III, care sînt adiacente cu sinapsa „în cartuș", formată de celula spino-stelată S1 în jurul prelungirii dendritice apicale a celulei piramidale desenată complet. Mai pot fi observați și alți neuroni inhibitori, S2 în stratul II, care au o acțiune mai restrînsă, conferind probabil mai multă finețe răspunsurilor modulare transmise de către celulele piramidale-stelate (Sp) din stratul II. Un alt interneuron inhibitor interesant este celula „în candelabru" (S7) al cărui axon formează sinapse multiple pe dendritele apicale a patru celule piramidale.

Mai pot fi remarcate celulele nevrogliforme ale laminei IV, care trimit axoni abundenți ce formează sinapse cu celulele Martinotti (S6). Axonii celulelor Martinotti se răsfrîng ascendent pentru a pătrunde în stratul I, unde se bifurcă. Cele două ramuri merg paralel cu suprafața și formează sinapse cu dendritele apicale ale celulelor piramidale, întocmai ca bifurcațiile axonilor fibrelor aferente de asociație și calosale.

Considerații generale asupra modulilor corticali. Figura 9.64 oferă o schemă sintetică a elementelor componente esențiale ale neocortexului în care sînt reprezentate deopotrivă conexiunile sinaptice excitatorii și cele inhibitorii, primele — în jumătatea din dreapta a schemei și ultima — în jumătatea din stînga. Central se află modulul format din ramurile aferente cortico-corticale (de asociație și calosale) care definesc un modul columnar de circa 300 μm diametru. Pe ambele laturi se află două discuri (în lamina IV formate de către terminațiile a două fibre *aferente specifice)* care nu se suprapun exact cu modulul cortico-cortical și care constituie alți moduli ce se extind de la stratul VI la II, ca urmare a acțiunii fibrelor aferente excitatorii secundare (prezentate și în discul din dreapta al figurii 9.64). În consecință, prima idee care trebuie reținută privitor la organizarea modulară este că în alcătuirea neocortexului coexistă modulii formați din aferențele cortico-corticale (de asociație și calosale) cu modulii formați din aferentele speciale, dar că acești moduli nu sînt în registru ci se calchează parțial. Modulul este o unitate funcțională, pe de o parte, pentru că dispune de un sistem de generare a impulsurilor și, pe de altă parte, pentru că este delimitat net de acțiunea inhibitorie a modulilor adiacenți.

În continuare, în evaluarea activității operaționale a sistemului de moduli ce compun scoarța cerebrală trebuie luate în considerație fasciculele orizontale de fibre din lamina I și din partea superioară a laminei II. Așa cum am arătat, aceste fibre au trei origini, ele fiind bifurcarea terminală a fibrelor de asociație și comisurale, precum și a axonilor Martinotti. Primele aduc un mare număr de impulsuri de la ambele emisfere, ultimele aduc impulsuri de la neuronii locali. Întrucît lungimea aproximativă a fibrelor paralele este de circa 5 mm, ele constituie un mecanism pentru difuzarea largă a impulsurilor la dendritele apicale ale celulelor piramidale din mai mulți moduli, cu care aceste fibre paralele se pun în contact pe traiectul lor printr-o singură

Scanned with OKEN Scanner

sinapsă. Este de presupus că sinapsele excitatorii ale fibrelor paralele nu sînt locuri generatoare de impulsuri pentru o celulă piramidală, deoarece fiecare fibră paralelă face o singură sinapsă cu spinii de pe dendritele periferice ale celulelor piramidale (locul probabil al generării impulsurilor nervoase este corpul celulei sau/și dendrita principală, la nivelul cărora se formează sinapse complexe ce includ sute de puncte sinaptice, cum este cazul sinapselor „în

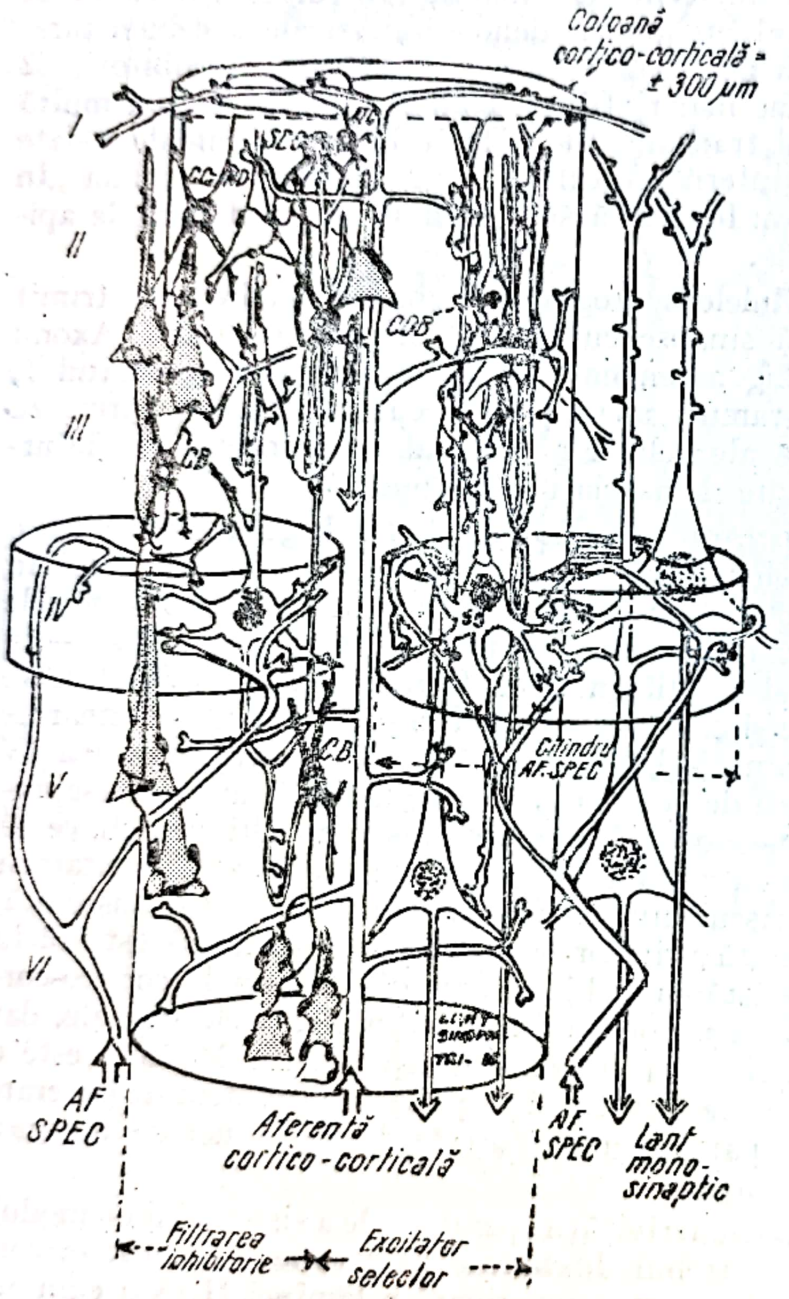


Fig. 9.64. — Schemă care ilustrează o singură coloană cortico-corticală și două discuri ale ramificațiilor fibrelor aferente specifice subcorticale. Stratificarea este indicată pe marginea stîngă. Jumătatea din dreapta a schemei indică impulsurile propagate în lanțul neuronilor excitatori, în timp ce în jumătatea din dreapta sînt figurați diferiți neuroni inhibitori (complet în negru) (explicații mai ample în text).

cartuș"). Luînd însă în considerație faptul că o celulă piramidală face sinapse cu circa 2 000 de fibre paralele, este foarte probabil ca aceste fibre să acționeze prin convergență. Astfel, fibrele paralele din lamina I și a II-a pot fi considerate ca dispozitive subtile și fine de modelare a activității neuronilor piramidali.

Scanned with OKEN Scanner

9.7.3.4. Concluzii

Cele două concepte, cel al organizării laminare și cel al organizăii modulare, abordează într-adevăr problema centrală a neurobiologiei actuale, și anume corelația dintre proprietățile unui singur neuron sau ale unei rețele neuronale și funcția generală a scoarței cerebrale.

Trebuie remarcat în primul rînd că sub raport faptic ambele concepte se întemeiază pe cele mai noi cunoștințe atît privitor la organizarea microscopică și ultramicroscopică a neocortexului, cît și la electrofiziologia neuronilor și a circuitelor interneuronale. Privite din acest punct de vedere, cele două teorii sînt complementare, ele întregindu-se reciproc și reprezentînd progrese substanțiale (deși din puncte de plecare diferite) în aprofundarea cunoașterii celui mai impresionant fenomen biologic care este creierul.

Deși funcția creierului se bazează într-adevăr pe cunoașterea aprofundată a elementelor neuronale componente cît și a complexelor rețele nervoase țesute de neuroni, aceasta nu contribuie în suficientă măsură la elucidarea funcției întregului sistem (a neocortexului). Achizițiile faptice trebuie încadrate în concepte teoretice suficient de generalizatoare pentru a cuprinde proprietățile sistemului ca un tot. Conceptele generale de care dispunem în prezent nu sînt suficiente decît pentru înțelegerea cîtorva funcții speciale, cum este cazul mirosului și al văzului.

9.7.4. SCOARȚA CEREBELULUI

9.7.4.1. Generalități

Suprafața cerebelului este foarte ondulată și, pe secțiunile microscopice de ansamblu, prezintă un aspect foarte clar subîmpărțit. Fiecare pliu are un centru de substanță albă care se deosebește net de suprafața cenușie sau scoarța cerebeloasă (fig. 9.65 și 9. 66). Substanța albă se colorează roz-intens cu hematoxilină-eozină și, ca și în emisferele cerebrale, este alcătuită din fibre nervoase mielinizate (care se pun clar în evidență prin impregnații argentice sau prin reacții cu tetraoxid de osmiu), celule nevroglice de susținere și vase mici, însă este complet lipsită de celule nervoase.

9.7.4.2. Structura microscopică a scoarței cerebeloase

Scoarța cerebeloasă este alcătuită din celule nervoase, prelungiri nervoase amielinice (axoni și dendrite) și celule nevroglice cu prelungirile lor. Aceste elemente se dispun în trei straturi foarte clar distincte în secțiunile histologice: *a)* stratul molecular extern, *b)* stratul celular Purkinje mijlociu și *c)* stratul granular intern (fig. 9.67 și 9. 68).

Structura biologică a scoarței cerebeloase a fost elucidată în esență de Ramon Y Cajal (1888). Cu foarte puține modificări, circuitele de bază stabilite de Cajal, valabile și în prezent, constau din șapte elemente nervoase. Două din acestea sînt *fibre nervoase aferente*, care aduc impulsul nervos la scoarța cerebeloasă din regiuni extracerebeloase; ele au fost denumite fibrele nervoase agățătoare și, respectiv, fibrele nervoase mușchioase. Pe lîngă acestea, în alcă-

Scanned with OKEN Scanner

tuirea scoarței cerebeloase mai intră și *cinci tipuri de neuroni*. Neuronii denumiți *celulele Purkinje*, al căror corp celular formează stratul cerebelos mijlociu, ocupă un loc special în arhitectura scoarței cerebeloase, deoarece axonul lor reprezintă singurele *fibre nervoase eferente* emise de acest teritoriu

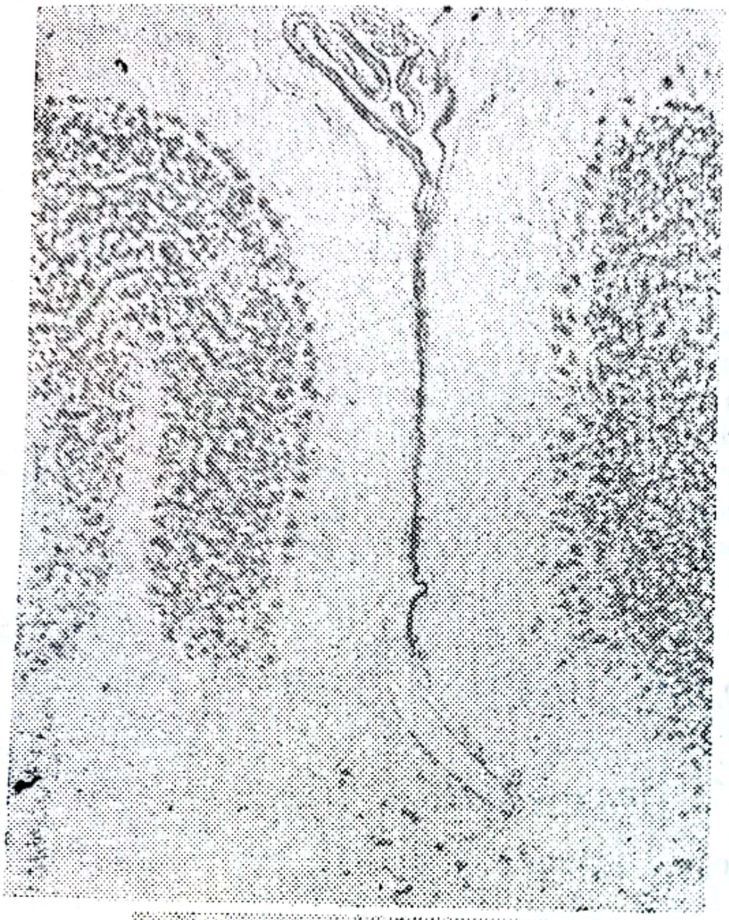


Fig 9.65. — Imagine microscopică a unei secțiuni în cerebel colorată cu HE. Vedere de ansamblu : sînt prezentate fragmente din două lamele cerebeloase în care se disting cele trei straturi ale scoarței cerebeloase (stratul molecular extern, stratul celular Purkinje și stratul granular intern). În centrul lamelei se distinge substanța albă care se continuă la baza lamelei. La suprafața lamelelor sînt prezentate plexurile coroide ale căror vase pătrund printre lamele, odată cu *pia mater*, și dau ramificații vasculare care pătrund în scoarță. Epiteliul coroidian se continuă la baza lamelelor cu celulele ependimare ce căptușesc o prelungire a ventriculului. Este surprins în secțiune și un nucleu de celule de la baza cerebelului (celulele nervoase au citoplasmă abundentă și intens colorată) care ajunge sub ventricul.

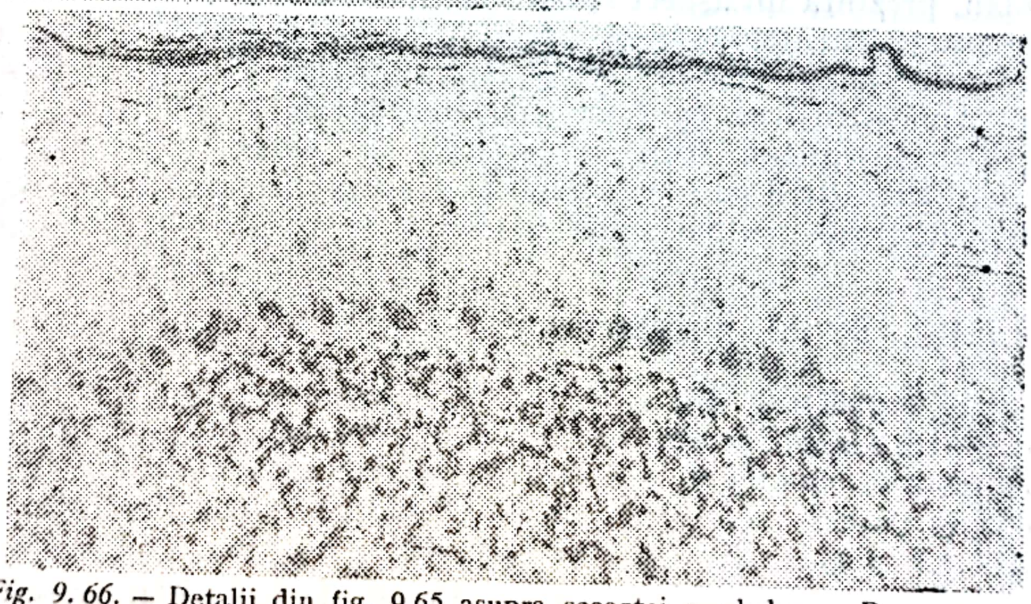


Fig. 9.66. — Detalii din fig. 9.65 asupra scoarței cerebeloase. De remarcat că neuronii sînt rari și mici în stratul molecular; stratul mijlociu este format din celule Purkinje dispuse într-un singur rînd, iar citoplasma abundentă și nucleii mari eucromatici; stratul granular conține celule foarte mici și foarte numeroase, care delimitează spații rotunjite, unde se formează sinapsele în formă de ghem între dendritele celulelor granulare și fibrele aferente mușchioase venite din substanța albă. Se observă și două capilare sanguine care se detașează din *pia mater* și pătrund în zona moleculară.

Scanned with OKEN Scanner

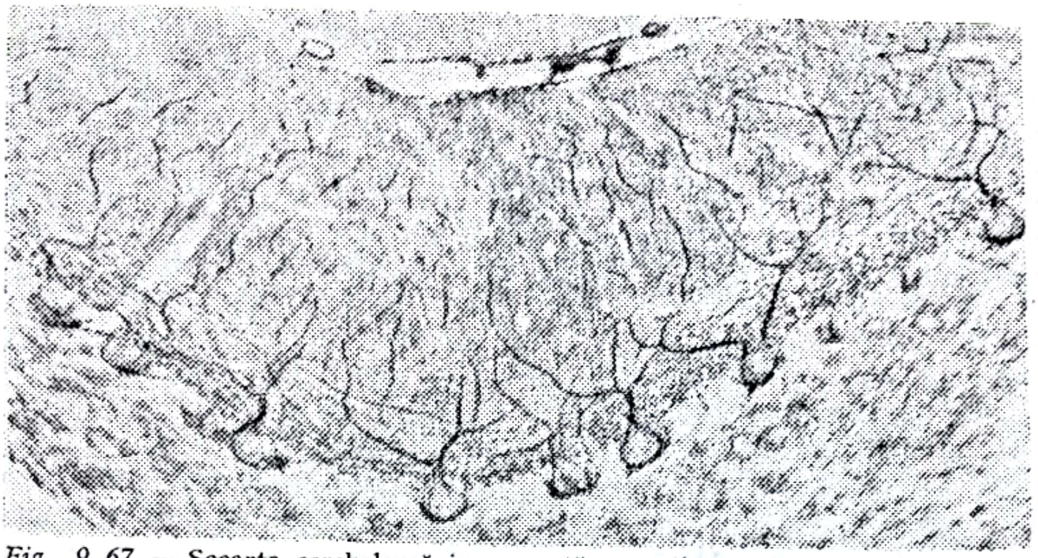


Fig. 9. 67. — Scoarța cerebeloasă impregnată argentic, pentru a se observa distribuția fibrelor nervoase. Celulele Purkinje trimit prelungiri dendritice caracteristice, care se ramifică în evantai în stratul molecular. Corpul celulelor Purkinje este înconjurat „în coșuleț" de terminațiile axonice trimise de celulele din stratul molecular. În stratul molecular, printre dendritele celulelor Purkinje, se remarcă fibre fine, paralele cu suprafața scoarței, care sînt axonii celulelor granulare din stratul intern. În stratul intern se remarcă ghemurile sinaptice formate din dendritele celulelor granulare, din fibrele mușchioase și din celulele Golgi tip II.

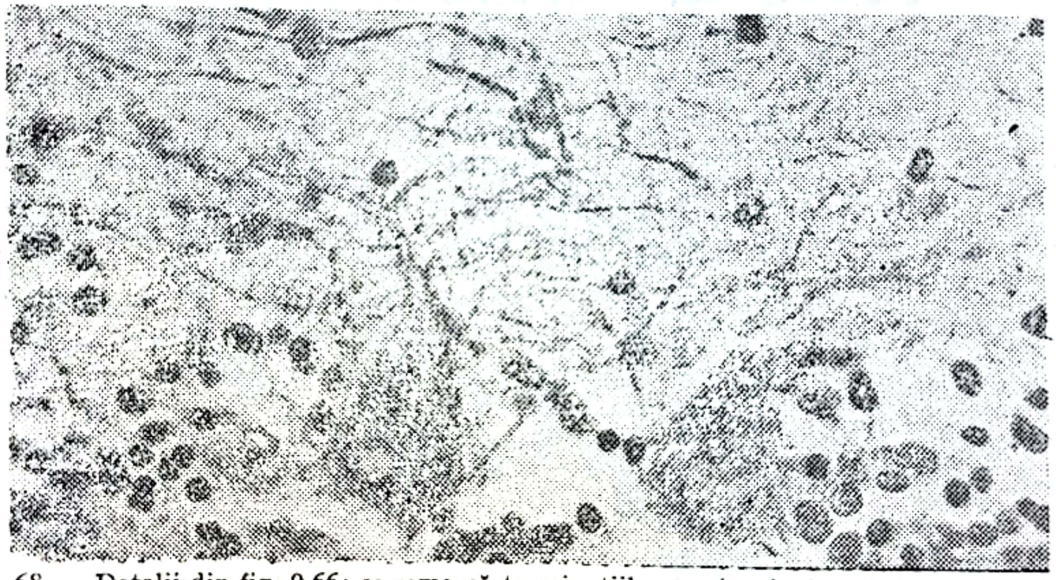


Fig. 9. 68. — Detalii din fig. 9.66: se remarcă terminațiile axonice în formă de coșuleț din jurul corpului celulelor Purkinje.

al sistemului nervos central. Celelalte patru tipuri de celule nervoase cerebeloase — *celulele granulare* și *celulele Golgi II* din stratul intern, precum și *celulele „în coșuleț"* și *celulele stelate* din stratul extern — sînt neuroni complet endogeni ai scoarței cerebeloase, deoarece prelungirile lor (axonice și dendritice) se distribuie în exclusivitate în unele din cele trei straturi ale cortexului cerebelos; din acest motiv cele patru celule sînt adeseori indicate ca interneuroni. Vom lăsa deoparte în mod deliberat cel de al treilea tip de fibre aferente raportat recent de Bloom (care sosesc la scoarța cerebeloasă de la *locus coeruleus*), deoarece nu este încă suficient de clar cum se integrează ele în concepția funcțională actuală despre scoarța cerebeloasă.

Scanned with OKEN Scanner

9.7.4.2.1. Celulele Purkinje

Celulele Purkinje sînt printre primii neuroni descoperiți în sistemul nervos central; ei poartă numele renumitului citolog ceh Johannes E. Purkinje, care i-a descris în 1837. Aceștia sînt printre cei mai complecși neuroni. Fiecare posedă un aparat dendritic foarte extins, care conduce impulsul la corpul celular în formă de pară, de unde pornește un axon foarte lung și subțire. Dendritele unei celule Purkinje umane pot forma între 100 și 250 de mii de sinapse cu fibre aferente, mai mult decît oricare altă celulă nervoasă (fig. 9.69).

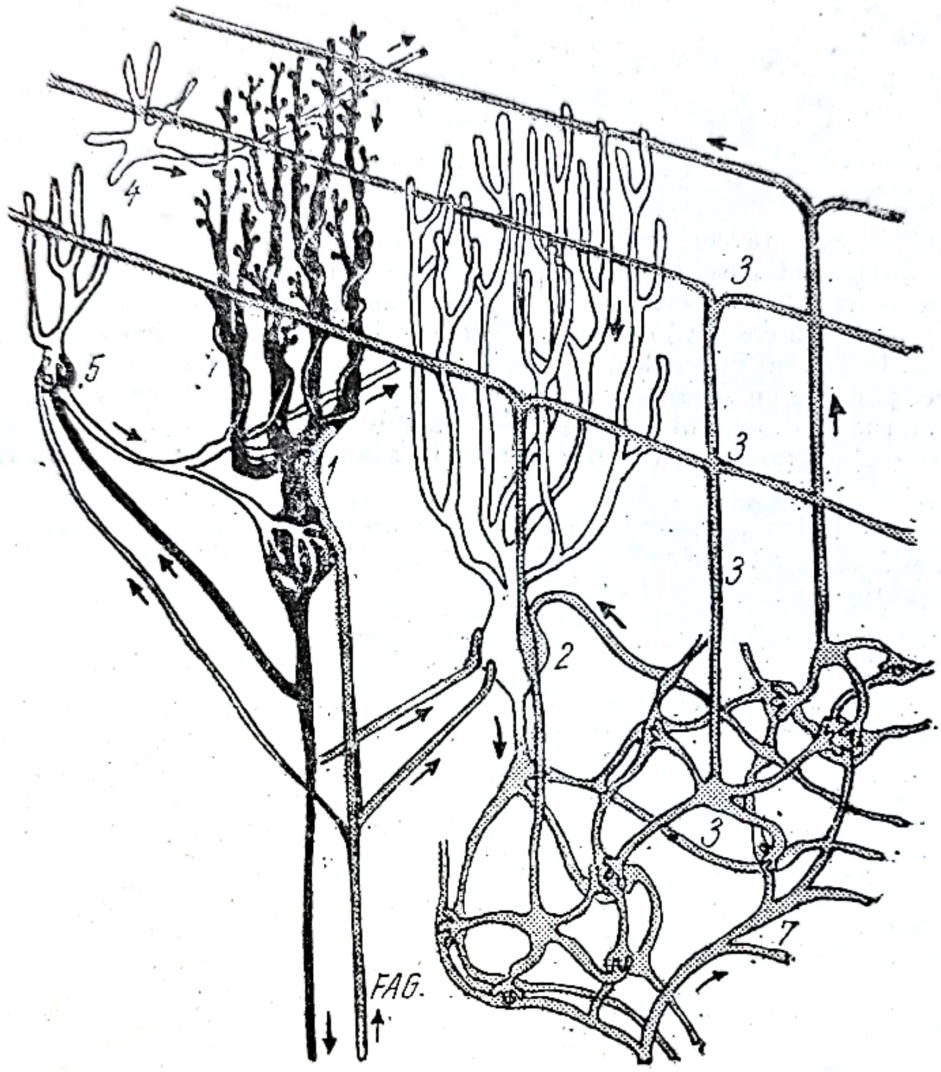


Fig. 9. 69. — Interrelațiile neuronale din cortexul cerebelos: fiecare celulă Purkinje *(1)* este asociată cu o singură fibră agățătoare *(F. Ag.)*, cu care formează cîteva sute de puncte sinaptice. Fibrele agățătoare mai trimit ramificații la celulele „în coșuleț" (5) și la celulele Golgi *(2)*. Fibrele mușchioase *(7)* se pun în contact cu ramificațiile în formă de gheare ale dendritelor celulelor granulare *(3)*, formînd o structură denumită glomerul cerebelos. Axonii celulelor granulare se divizează ascendent, pentru ca în stratul molecular să formeze fibrele paralele, după ce se ramifică în „T". Fiecare fibră paralelă vine în contact cu dendritele unei celule Purkinje o singură dată. Celulele stelate *(4)* fac contact (prin axonul lor) cu mai multe fibre paralele care au făcut sinapse cu aceeași celulă Purkinje. Celulele „în coșuleț" fac sinapse cu corpul mai multor celule Purkinje. Numeroasele dendrite ale celulelor Golgi *(2)* fac sinapse cu fibrele paralele în stratul molecular; axonii celulelor Golgi se termină la suprafața glomerulilor cerebeloși.

Scanned with OKEN Scanner

Celulele Purkinje sînt pivotul rețelei nervoase din cortexul cerebelos. Ele se extind în toate straturile scoarței cerebeloase: corpul neuronilor este dispus în „palisadă" pentru a constitui o „lamă" unicelulară care reprezintă stratul intermediar al scoarței cerebeloase, cel al celulelor Purkinje (vezi fig. 9.66); dendritele se extind ramificîndu-se abundent deasupra stratului celulelor Purkinje, în stratul molecular extern; axonii sînt orientați în direcția opusă dendritelor, pătrund în stratul granular cerebelos și de aici trec în substanța albă din centrul cerebelului, de unde pot emite ramificații colaterale care pătrund în grămezile de substanță cenușie, denumite nuclei cerebeloși (vezi fig. 9.65). Nucleii de la baza cerebelului mai primesc ramificații colaterale și de la fibrele aferente scoarței cerebeloase, și anume de la fasciculele de fibre agățătoare, precum și de la fasciculele de fibre mușchioase. Nucleii reprezintă astfel stații intermediare unde informațiile care sosesc la cerebel sînt asociate cu cele emise din scoarța cerebeloasă, pentru ca apoi să fie retransmise fie la alte părți ale creierului, fie, prin măduva spinării, în diferite regiuni ale corpului.

Dendritele celulelor Purkinje au un aranjament neobișnuit, care este în același timp cea mai caracteristică particularitate structurală și un foarte important element funcțional. Întreaga masă a ramificațiilor dendritice ale unei celule se desfășoară într-un singur plan ca și cînd ar fi o frunză presată. Mai mult, planurile tuturor dendritelor dintr-o regiune dată sînt paralele, așa încît dendritele șirurilor de celule se prezintă în stive foarte net ordonate; celule adiacente, emițînd dendrita în același plan, se dispun ordonat ca filele dintr-o carte. Această dispoziție a dendritelor în șiruri foarte ordonate determinată natura și numărul contactelor cu alte celule nervoase. Astfel, fibre orientate perendicular pe planul dendritelor și paralele între ele vor putea intersecta un număr mare de celule Purkinje, deși ele vor atinge fiecare celulă o singură dată. Fibre nervoase paralele sînt numeroase în stratul molecular și constituie unul din elementele sistemului aferent al scoarței cerebeloase.

Celulele Purkinje, prin axonul lor, reprezintă singurul sistem eferent care pleacă de la scoarța cerebeloasă, dar el nu este un simplu transmițător automat de informații care-și au originea în altă parte. Axonii eferenți sînt parte a unui sistem indivizibil de neuroni iar activitatea lor este determinată în întregime de felul în care ceilalți neuroni sînt asociați cu celule Purkinje și cu alte celule.

9.7.4.2.2. Fibrele agățătoare

Fibrele agățătoare și fibrele mușchioase, cele două sisteme aferente care în ultimă instanță aduc impulsuri nervoase la celulele Purkinje, sînt distribuite în cortexul cerebelos într-un aranjament mai mult sau mai puțin ordonat. Ele se găsesc constant în toate zonele cortexului cerebelos și sînt prezente la toate vertebratele. Cele două sisteme diferă însă radical; într-un anumit fel ele se află la două extremități opuse în sistemul nervos central (vezi fig. 9.69).

Fiecare fibră agățătoare este virtual o linie particulară destinată unei anumite celule Purkinje. Aceste fibre își au originea în alte regiuni ale creierului, în olivele inferioare, un nucleu compact de celule nervoase din bulbul rahidian *(medulla oblongata)*. Axonii acestor celule ajung la cortexul cerebe-

Scanned with OKEN Scanner

los sub denumirea de fibre agățătoare, după ce au trimis colaterale la nucleii cerebeloși de la bază. În cursul dezvoltării embrionare „fibrele agățătoare" sînt primul sistem aferent care abordează celulele Purkinje și de îndată ce o fibră se atașează de celula sa țintă, ea își amplifică monogamia. Pe măsură ce celulele Purkinje își extind evantaiul lor dendritic, fibrele agățătoare le urmează, răsucindu-se în jurul dendritelor ca o iederă pe trunchiul și pe ramurile unui copac. Se apreciază că o celulă Purkinje și fibra sa agățătoare stabilesc circa 300 de punte sinaptice, ceea ce constituie o excepție în sistemul nervos.

Stimularea unei fibre agățătoare produce o excesiv de puternică excitație a celulei Purkinje corespunzătoare. Celula Purkinje respectivă răspunde printr-o explozie prelungită de potențial de acțiune de înaltă frecvență a cărei înregistrare electrică dovedește că celula nervoasă se descarcă complet. Intensitatea răspunsului este de așteptat, dat fiind numărul mare de sinapse. Excitația este capabilă să răstoarne orice alt stimul sosit la celula Purkinje respectivă.

9.7.4.2.3. Fibrele mușchioase

În timp ce fibrele agățătoare formează numeroase conexiuni cu o singură celulă Purkinje, fibrele mușchioase excită, în ultimă instanță, mai multe celule Purkinje, dar stabilesc numai unul sau cîteva contracte cu fiecare din ele. În cadrul întregului sistem nervos, fibrele mușchioase ocupă un loc special, deoarece o singură fibră stimulează un foarte mare număr de neuroni (celule Purkinje).

Pentru a putea acționa asupra unui număr cît mai mare de celule Purkinje, ele nu se termină direct pe acestea (cum este cazul fibrelor agățătoare) ci pe mici neuroni, celulele granulare, care sînt plasați imediat sub stratul Purkinje. Celulele granulare servesc drept neuroni intermediari mărind enorm numărul de celule Purkinje stimulate de o singură fibră aferentă (vezi fig. 9.69).

Unul din motivele pentru care celulele granulare pot intersecta atît de multe celule Purkinje este acela că celulele granulare însele sînt foarte numeroase (după calculele unor cercetători actuali, ele ar fi de circa 10 ori mai multe decît totalul neuronilor care s-a crezut în trecut a fi prezenți în creier).

Axonii celulelor granulare se dirijează la suprafață, trec printre celulele stratului Purkinje și pătrund în stratul molecular. Aici se împart în două ramuri care se orientează în direcții opuse, astfel încît ei iau forma literei „T". Fibrele care reprezintă partea orizontală a „T"-ului ocupă toate nivelurile stratului molecular. Orientarea acestor fibre este precis determinată — toate sînt paralele una cu alta (și pentru acest motiv ele sînt denumite fibre paralele) și perpendiculare pe planul evantaiului format de dendritele celulelor Purkinje. Aranjamentul este deci, într-un fel, similar firelor de telefon de pe stîlpii de telegraf cu mai multe fire. În fapt, conformația acestor fibre este complicată de neregularitățile scoarței cerebeloase (vezi fig. 9.69).

Fibrele paralele vin în contact cu spinii de pe dendritele celulelor Purkinje. În general fibrele paralele vin în contact o singură dată cu o anumită celulă Purkinje, rareori de două ori. O singură celulă Purkinje umană poate să facă sinapsă cu circa *100—250 mii* de fibre paralele (comparativ cu o singură fibră agățătoare).

Scanned with OKEN Scanner

Stimularea fibrelor muşchioase, ca şi a celulelor granulare are efect excitator (ca şi cel al fibrelor agăţătoare). Totuşi efectul fibrelor muşchioase este, pentru motive evidente, difuz şi complex, în contrast cu efectul puternic şi concentrat al fibrelor agăţătoare. În figura 9.70 sînt schematizate circuitele excitatorii cerebeloase.

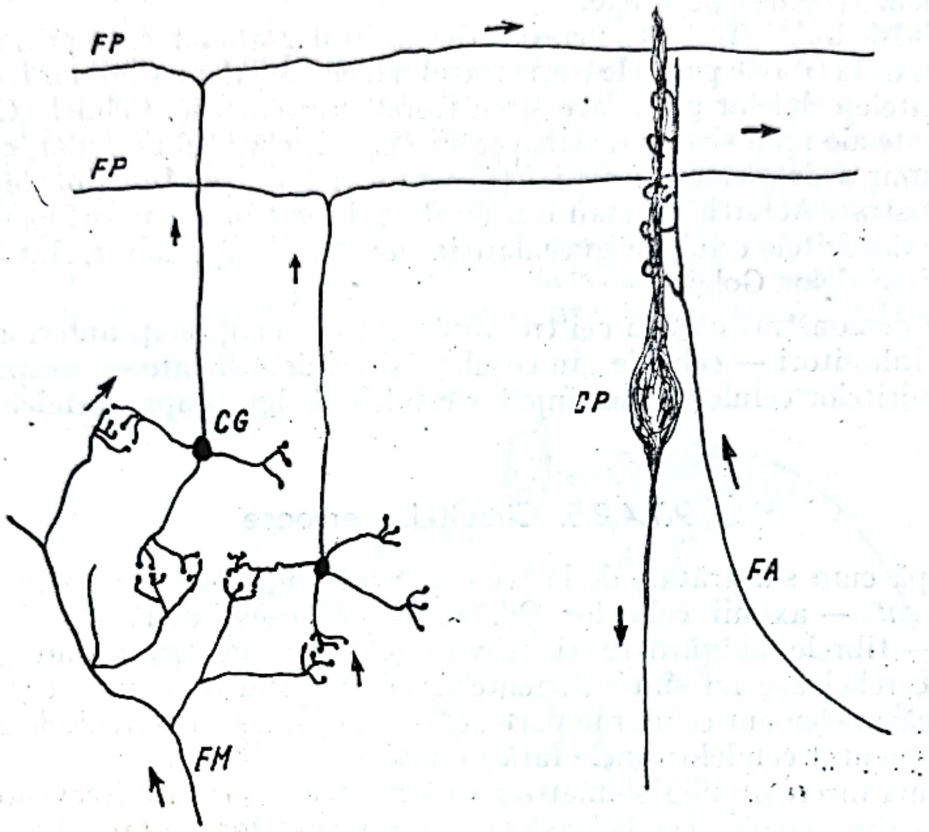


Fig. 9.70. — Schema circuitelor cerebeloase excitatorii. Neuronii inhibitori sînt omişi:
CP — celule Purkinje; *CG* — celule granulare; *FM* — fibre muşchioase; *FP* — fibre paralele; *FA* — fibre agăţătoare.

9.7.4.2.4. Interneuronii

În matricea circuitului cerebelos se află incluse şi două seturi de interneuroni care, spre deosebire de celulele granulare, au axoni scurţi. Un set este localizat în stratul molecular şi constă din celulele „în coşuleţ" şi celulele stelate; celălalt se află în stratul granular şi este reprezentat de celulele Golgi (vezi fig. 9.69). Aceşti interneuroni sînt inhibitori.

Celulele „în coşuleţ" şi celulele stelate sînt similare şi pot fi considerate membre ale aceleiaşi clase (vezi fig. 9.68). Ambele primesc impulsuri de la fibrele paralele şi acţionează, prin axonul lor, asupra celulelor Purkinje. Principala diferenţă între cele două tipuri este aceea că axonul celulelor „în coşuleţ" formează sinapse cu celulele Purkinje la baza dendritelor şi în jurul

Scanned with OKEN Scanner

corpului acestor neuroni, în timp ce axonul celulelor stelate se termină numai la nivelul extremităților dendritice Purkinje. Mai semnificativ este probabil faptul că axonul celulelor „în coșuleț", ca și cel al celulelor stelate, este perpendicular atît pe fibrele paralele cît și pe axul principal (dendro-axonic) al celulelor Purkinje. În consecință, rețeaua proceselor celulare din stratul molecular constă în trei tipuri de prelungiri (dendritele celulelor Purkinje, fibrele paralele, precum și axonii celulelor stelate și ai celulelor „în coșuleț") care sînt perpendiculare unele pe altele.

Celulele Golgi sînt interneuroni din stratul granular care primesc și ele impulsuri de la fibrele paralele (din stratul molecular) dar axonii lor fac sinapse cu dendritele celulelor granulare și cu fibrele mușchioase. Celulele Golgi sînt componente ale unui sistem de sinapse speciale din stratul granular, cunoscute sub denumirea de *glomeruli cerebeloși*, care sînt unitățile funcționale de bază din acest strat. Acestea constau din umflături ale fibrelor mușchioase, înconjurate de dendritele celulelor granulare iar acestea, la rîndul lor, sînt acoperite de axonii celulelor Golgi.

S-a demonstrat că toți cei trei interneuroni menționați anterior se comportă ca inhibitori — celulele „în coșuleț" și celulele stelate —, asupra corpului și dendritelor celulelor Purkinje iar celulele Golgi, asupra celulelor granulare.

9.7.4.2.5. Circuitele nervoase

După cum s-a arătat, de la scoarța cerebelului pleacă un singur tip de fibre *eferente* — axonii celulelor Purkinje — și sosesc două tipuri de fibre aferente — fibrele agățătoare și cele mușchioase. Pentru a înțelege rolul scoarței cerebeloase nu sînt suficiente datele privind organizarea și proprietățile fiecărui element celular în parte, ci trebuie cunoscute circuitele nervoase, comportamentul celulelor unele față de altele.

Prima încercare de sistematizare a circuitelor nervoase (secvenței evenimentelor) din scoarța cerebeloasă, în lumina datelor despre ultrastructura și citofiziologia neuronilor, a fost făcută de J. Szentàgothài de la Facultatea de Medicină din Budapesta. În conformitate cu această ipoteză, stimularea unui mic grup de fibre mușchioase determină următoarea secvență de evenimente: *a)* activează, prin intermediul celulelor granulare și al fibrelor paralele emise de acestea, un șir larg de celule Purkinje, precum și toate cele trei tipuri de interneuroni inhibitori; *b)* ulterior interacțiunile dintre neuroni tind să limiteze extinderea și durata răspunsului. Activarea celulelor Purkinje, pe calea fibrelor paralele, este imediat inhibată de către celulele „în coșuleț" și de cele stelate care sînt activate pe calea acelorași fibre paralele. Deoarece axonii celulelor „în coșuleț și ai celulelor stelate sînt orientați în unghi drept față de fibrele paralele, acțiunea lor inhibitorie nu se limitează la celulele Purkinje activate în faza „*a*"; *c)* neuronii (Purkinje) plasați pe ambele laturi ale coloanei de celule Purkinje stimulate în faza „*a*" sînt de asemenea supuși unei puternice inhibiții. Astfel efectul inhibitor al interneuronilor este acela de a accentua limitele și de a crește contrastul între grupul de celule Purkinje activate (denumite modul) și cele care nu sînt activate; *d)* în același timp fibrele paralele și fibrele mușchioase activează și celulele Golgi din stratul granular. Celulele Golgi își manifestă acțiunea lor inhibitorie asupra celulelor granulare și au ca efect suspendarea activității fibrelor paralele. Acesta este

Scanned with OKEN Scanner

un mecanism de *feed back* negativ: prin stimularea celulelor Golgi, fibrele paralele își suprimă proprii săi stimuli. Rezultatul net al tuturor interacțiunilor neuronale din scoarța cerebeloasă, în conformitate cu ipoteza lui Szentàgothài, este o scurtă stimulare a unei populații de celule Purkinje (a unui modul) relativ mare dar net delimitată.

Aproape concomitent cu stabilirea proprietăților funcționale ale circuitelor neuronale pe baza ipotezei de mai sus, M. Ito de la Universitatea din Tokyo a schimbat perspectiva comportării întregului sistem. Ito și colaboratorii săi au stabilt că celulele Purkinje însele sînt neuroni inibitori. Astfel, efectul final al circuitelor nervoase din scoarța cerebeloasă este acela de a organiza pe scară largă inhibiția neuronilor din nucleii de la baza cerebelului. Mai mult, a devenit evident că din toate celulele scoarței cerebeloase, numai celulele granulare sînt celule excitatorii; toți ceilalți neuroni sînt inhibitori. Aceste lucrări au permis progrese esențiale în înțelegerea funcției scoarței cerebeloase. Stimularea celulelor nervoase care dau naștere fibrelor argățătoare și a fibrelor mușchioase are drept consecință activarea

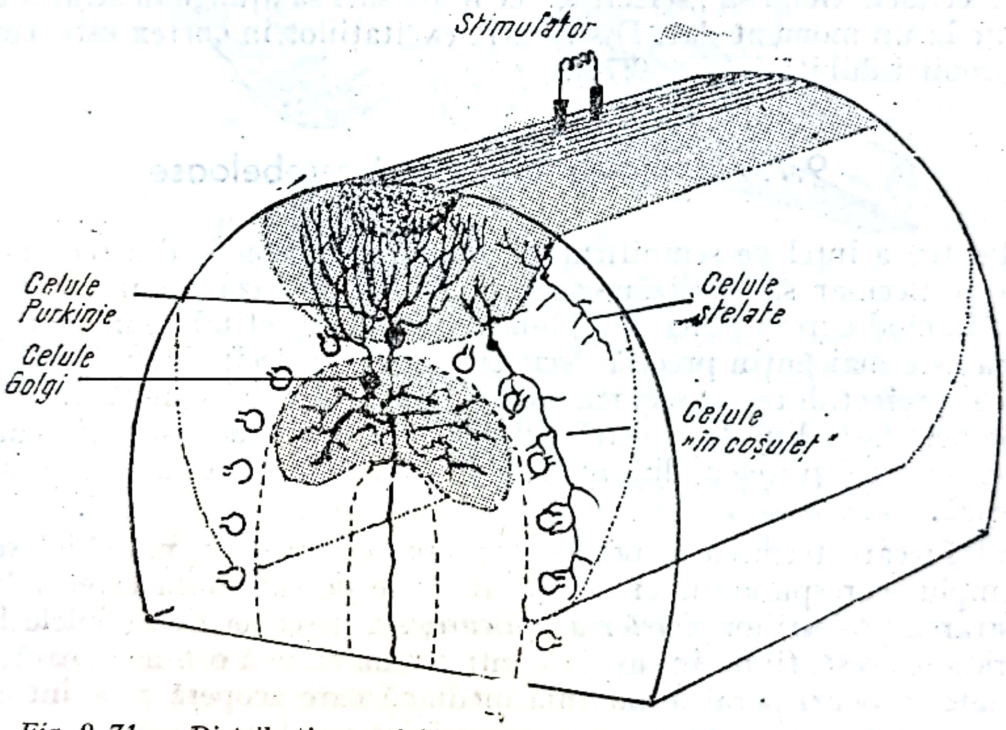


Fig. 9.71. — Distribuția spațială a excitațoiilor în cortextul cerebelos este determinată în mare măsură de către neuronii inibitori. Atunci cînd un scurt stimul electric este aplicat pe suprafața cortexului cerebelos, este activat un pachet de fibre paralele (suprafața striată) și acestea există în toate dendritele aflate imediat sub ele (aria 1). Astfel sînt stimulate celulele Purkinje, celulele stelate, celulele „în coșuleț" și celulele Golgi. Excitația celulelor Purkinje este singurul stimul care pleacă de la cortexul cerebelos; ceilalți neuroni servesc pentru a determina care celule Purkinje pot emite impulsurile. Deoarece axonii celulelor „în coșuleț" și ai celor stelate se extind în unghi drept cu fibrele paralele din stratul molecular, ele inhibă celulele Purkinje pe o suprafață largă (aria 2) de ambele părți ale regiunii excitate. Celulele Golgi (ale căror dendrite sînt și ele stimulate) generează o zonă de inhibiție a celulelor granulare (zona 3), care se află în dreptul fibrelor paralele ce au primit excitația inițială. Deoarece fibrele paralele care au fost stimulate la începutul experienței sînt axonii celulelor granulare subiacente, inhibiția transmisă în final de celulele Golgi are drept efect terminarea procesului excitator.

Scanned with OKEN Scanner

nucleilor cerebeloşi şi, prin aceştia, a sistemului corespunzător cerebral şi spinal. Această activitate este brusc suprimată pe calea semnalelor inhibitorii provenite de la scoarţa cerebeloasă.

Din multe puncte de vedere cele două modele privitoare la circuitele nervoase cerebeloase pot fi considerate ca fiind prea simpliste. Ele sînt doar primele încercări de a corela structura cu funcţia într-o zonă foarte importantă a sistemului nervos central. Nu trebuie neglijat faptul că circuitele neuronale indicate mai sus sînt stabilite pe calea aplicării unor stimuli bruşti (cum este aplicarea externă a unui potenţial electric) şi că aceştia nu pot fi identici cu stimulii fiziologici care acţionează constant asupra scoarţei cerebeloase. Aşa, de exemplu, este probabil că neuronii inhibitori din stratul molecular, în condiţii fiziologice, nu blochează activitatea unui întreg grup de celule Purkinje, în timp ce o stimulează pe a altora (după cum se stipulează în ipoteza lui Szentàgothài). Este mai probabil că ele intervin pentru a regla pragul de excitabilitate a diferitelor grupe de neuroni şi, pe această cale, ele controlează dinamica cîmpurilor active ale scoarţei cerebeloase. Datorită contactelor sale directe atît cu fibrele muşchioase cît şi cu cele agăţătoare este probabil ca celulele Golgi să „selecteze" ce impulsuri să ajungă la stratul de celule Purkinje la un moment dat. Distribuţia excitaţiilor în cortex este controlată de neuronii inhibitori (fig. 9.71).

9.7.4.3. Funcţiile scoarţei cerebeloase

Pentru a înţelege semnificaţia circuitelor neuronale din scoarţa cerebeloasă este necesar să analizăm aceste circuite pe baza naturii informaţiilor primite în mod curent. Una din tehnicile cele mai profitabile în acest scop (cu toate că este mai puţin precisă decît citologia sau decît electrofiziologia) este cartarea proiecţiilor pe scoarţa cerebelului. Aceasta constă în selectarea fibrelor nervoase din afara cerebelului, de origine sau destinaţie cunoscută, şi determinarea ţintelor din interiorul scoarţei cerebeloase asupra cărora acţionează.

a) Fiecare terminaţie nervoasă proprioceptivă în muşchiul scheletal, de exemplu, corespunde unei poziţii anumite pe suprafaţa cerebelului. Prin înregistrarea proiecţiilor *fibrelor agăţătoare*, s-a descoperit că celulele Purkinje care primesc aceste fibre sînt aşezate într-o remarcabilă ordine lineară; ele sînt organizate în benzi paralele pe linia mediană care acoperă zone întinse ce se extind peste mai multe pliuri ale cortexului cerebelos (fig. 9.72).

Această cartare confirmă cercetările anterioare ale lui J. Voogd, care, studiind efectul unor mici leziuni ale olivei inferioare (una din principalele surse ale fibrelor agăţătoare), constată că degenerările induse în scoarţa cerebeloasă au aspectul unor lungi benzi orientate de la frunte spre ceafă, adică paralel cu planul median. Descoperirea sa sugerează că benzile longitudinale sînt un principiu important de organizare a proiecţiilor fibrelor agăţătoare pe cortexul cerebelos. Acest model a fost identificat şi la alte specii de vertebrate.

De asemenea, unele cercetări farmacologice (utilizarea unui extract dintr-o plantă denumită harmol, care provoacă tremurături ca urmare a acţiunii sale activatoare asupra neuronilor din oliva inferioară) dovedesc că olivele inferioare (ai căror axoni ajung în nucleii cerebeloşi şi apoi la celulele

Scanned with OKEN Scanner

Purkinje sub denumirea de fibre agățătoare) sînt parte din sistemul de comandă motor implicat în mișcările musculare.

Pe baza datelor de mai sus, este rezonabil să presupunem că sistemul fibrelor agățătoare este implicat în mișcările sincrone ale unor grupuri de mușchi, interesînd probabil mai mult decît un singur membru. Este de asemenea rezonabil să credem că acestea țin sub dependența lor în principal mișcările rapide. Inhibiția nucleilor cerebeloși de către celulele Purkinje va surveni foarte repede după activarea nucleilor (de către colateralele fibrelor agățătoare), generînd un puternic dar scurt semnal de comandă.

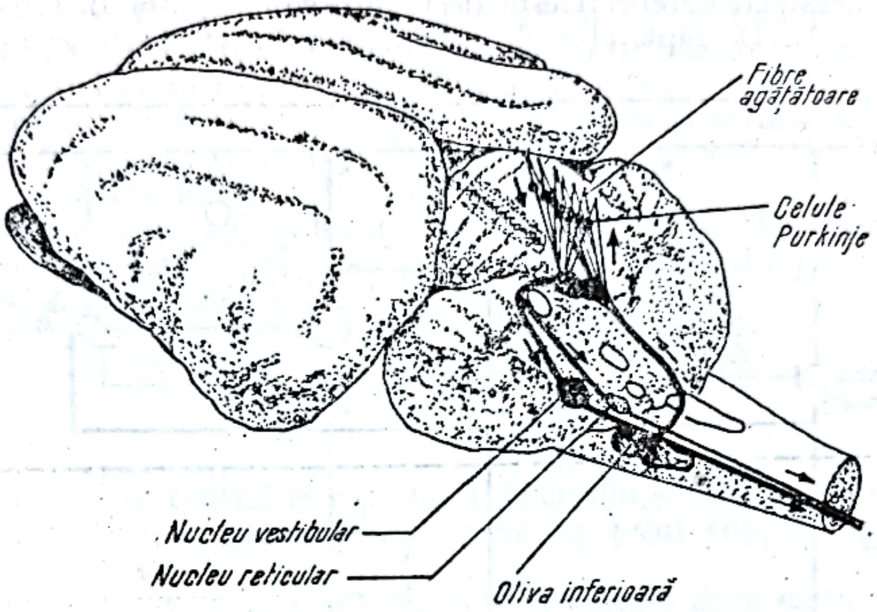


Fig. 9.72. — Proiecția fibrelor agățătoare în scoarța cerebeloasă. Fibrele își au originea în cele două olive inferioare ale trunchiului cerebral. Fibrele de la fiecare olivă se termină în scoarța cerebeloasă a emisferei opuse. Terminațiile sînt orientate în șiruri longitudinale care traversează numeroase circumvoluțiuni corticale. Ramuri ale fibrelor agățătoare ajung de asemenea la nucleii cerebeloși (aici este indicat nucleul fastigial), unde sosesc de asemenea axonii celulelor Purkinje. Impulsurile pornite de la nucleul fastigial formează stații în nucleii vestibular și reticular.

b) Efectul stimulării *fibrelor mușchioase* este atît de diferit de cel al fibrelor agățătoare, încît este posibil ca cele două sisteme să „separe în timp" celulele Purkinje, fiecare dintre ele folosindu-le în scopuri foarte diferite. Fibrele mușchioase sînt active numai pe suprafețe întinse și nu asupra celulelor individuale; ele antrenează de asemenea intervenția interneuronilor inhibitori, care pot modula și detecta tipul semnalelor sosite la scoarța cerebeloasă. Celulele Golgi în special pot fi implicate în a determina ce tip de informație să fie transmis prin fibrele paralele; mai mult, după aranjamentul „separării în timp", ele pot împărți celulele Purkinje între cele două sisteme.

Sistemul fibrelor mușchioase este implicat în coordonarea mișcărilor globului ocular. Două regiuni ale cerebelului se știe că participă la această funcție: una este aria floculo-nodulară; aceasta reglează poziția ochilor față de orientarea capului și a corpului permițînd ca ochii să privească fix un punct, în timp ce capul sau corpul se mișcă; cel de al doilea este vermisul cerebelos care se crede că este implicat în controlul mișcărilor rapide, sacadate, importante în urmărirea vizuală.

Scanned with OKEN Scanner

Recent s-a dovedit că activarea celulelor Purkinje pe calea fibrelor mușchioase se face cu circa 25 milisecunde înainte ca ochii să înceapă să se miște. Această descoperire arată că cerebelul, pe calea impulsurilor primite de la fibrele mușchioase, este capabil să corecteze ordinele greșite înainte ca ele să ajungă la mușchi, acționînd, se pare, ca o frînă.

c) Nu mai există nici o îndoială că cerebelul este un element central de control pentru organizarea mișcărilor. El nu inițiază mișcările, acestea putînd fi generate în absența sa, dar el modulează și reorganizează comanda motorie și, prin coordonarea diferitelor semnale, permite obținerea unei eficiențe maxime a acesteia. Cerebelul este deci un organ reglator în sensul cel mai înalt (fig. 9.73). De fapt, el reglează mai mult decît performanța motorie.

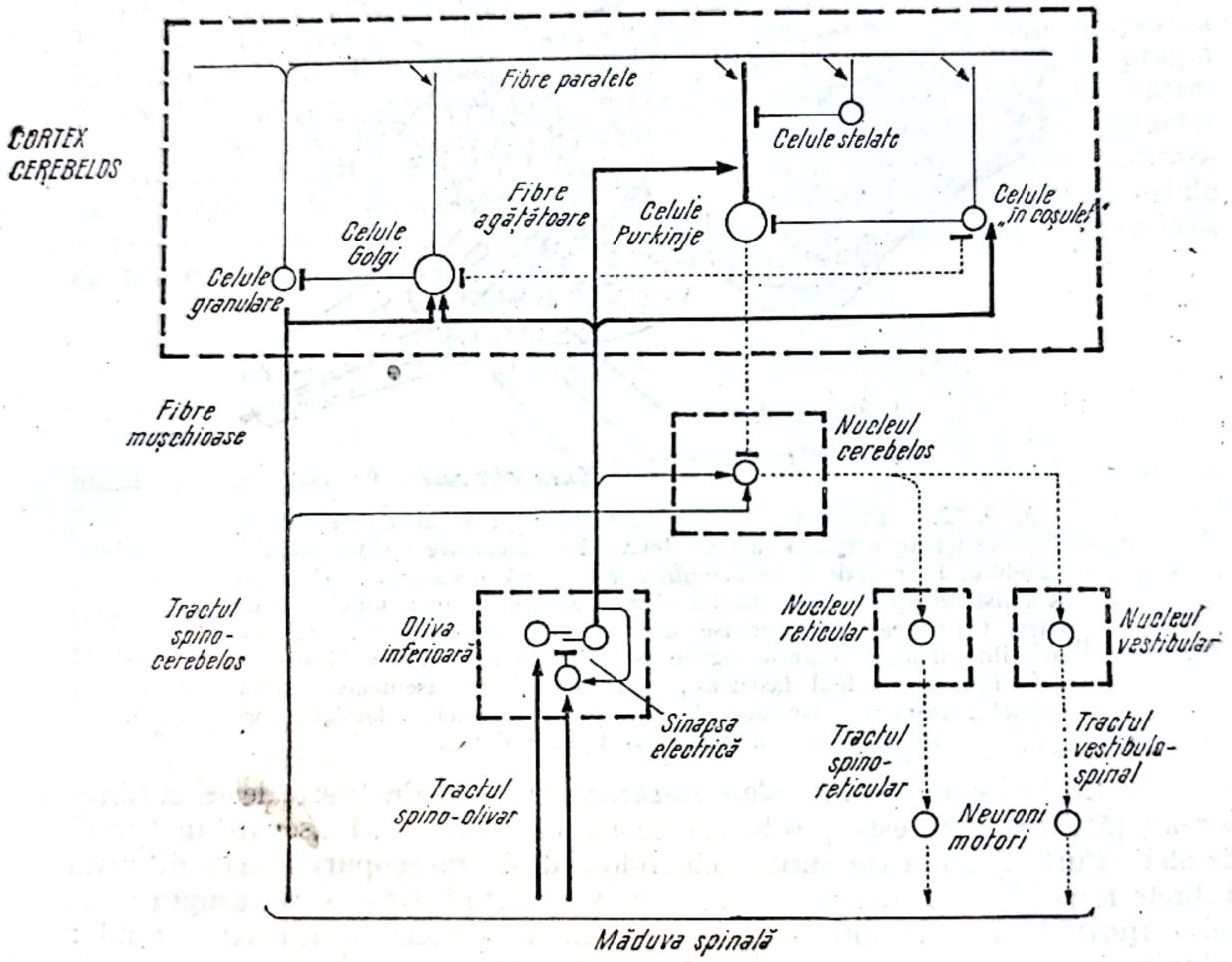


Fig. 9.73. — Schema „circuitelor" cortexului cerebelos și a centrilor cerebrali cu care se află în legătură. Liniile groase indică principalele căi aferente; liniile punctate reprezintă calea aferentă; liniile subțiri, continue reprezintă căile principale intracorticale sau ramificații colaterale; vîrful săgeții semnifică „excitația" și talpa ei, „inhibiția". Impulsurile sosesc la cortex pe calea fibrelor agățătoare și mușchioase, amîndouă emițînd colaterale și la nucleii cerebeloși. În cortex ambele aferențe acționează în ultimă instanță asupra celulelor Purkinje; răspunsul acestor celule este influențat de trei tipuri de interneuroni, toți inhibitori. Deoarece și celulele Purkinje sînt tot inhibitorii, efectul lor asupra nucleilor cerebeloși este de a preveni transmiterea impulsului nervos primit pe calea colateralelor fibrelor agățătoare și mușchioase, care altfel ar ajunge la neuronii motori și ar da naștere mișcărilor. Astfel, cortexul cerebelors pare a fi un organ reglator, însărcinat cu selecționarea unor comenzi motorii pentru a fi transmise, barîndu-le pe toate celelalte.

Așa de exemplu, la peștele electric cerebelul atinge dimensiuni enorme și ocupă aproape în întregime cavitatea craniană.

Fără îndoială, cerebelul este mult mai complex decît o cutie care compară poziția mușchilor cu comanda dată de creier, după cum presupuneau Sherrington și contemporanii săi. Așa de exemplu, s-a arătat că cerebelul este capabil să coordoneze mișcările chiar și în absența oricărei informații de la periferia corpului. De asemenea, s-a dovedit că activitatea cerebeloasă este implicată și în starea internă a sistemului nervos central. Astfel s-a demonstrat că principalul fascicul aferent al cerebelului, tractul spino-cerebelos ventral, transportă informații nu direct despre statusul corpului în raport cu mediul înconjurător, ci despre activitatea neuronilor inhibitori interneuronali din măduva spinării. Un astfel de mecanism de monitorizare internă este cît se poate de necesar pentru un sistem destinat să perfecționeze sau să revizuiască comanda motorie, înainte ca aceasta să ajungă la mușchi, așa cum se observă în cazul controlului cerebelos asupra mișcării ochilor.

Perfecționarea mecanismelor de coordonare motorie este desigur o achiziție dobîndită adaptativ. Astfel se raportează că în decursul a peste un milion de ani de evoluție a omului, cerebelul a crescut de 3—4 ori.

9.7.5. MENINGELE

Sistemul nervos central este protejat de craniu și de coloana vertebrală. El este de asemenea acoperit de membrane de țesut conjunctiv denumite meninge.

Pornind de la exterior, meningele sînt denumite *dura mater*, *arahnoida* și *pia mater*. *Dura mater* mai este denumită și *pahimeninge*. Arahnoida și *pia mater* sînt legate împreună și sînt considerate un strat unitar denumit pia-arahnoidă sau *leptomeninge* (fig. 9.74).

9.7.5.1. Dura mater

Dura mater este meningele extern, alcătuit din țesut conjunctiv dens, care se continuă cu periostul cutiei craniene. *Dura mater* care învelește măduva spinării este separată de periostul vertebral prin spațiul *epidural*, care conține vene cu pereți subțiri, țesut conjunctiv lax și țesut adipos. *Dura mater* este întotdeauna separată de arahnoidă prin spații fine, spații subdurale. Întreaga față internă a durei mater, ca și fața ei externă de la nivelul măduvei spinării, sînt acoperite de mezoteliu de origine mezenchimală.

9.7.5.2. Arahnoida

Arahnoida are două componente — un strat în contact cu *dura mater* și un sistem de trabecule care leagă stratul extrem cu *pia mater*. Cavitățile dintre trabecule formează *spațiile subarahnoide*, care sînt umplute cu lichid cefalorahidian și complet separate de spațiile subdurale. Arahnoida este compusă din țesut conjunctiv lipsit de vase sanguine. Suprafețele sale sînt acoperite de mezoteliu scuamos, asemănător cu cel al durei mater. Deoarece

Scanned with OKEN Scanner

în măduva spinării arahnoida are mai puține trabecule, ca poate fi distinsă de *pia mater* mai clar în această regiune a sistemului nervos central.

În unele regiuni, arahnoida perforează dura mater, formînd protruziuni

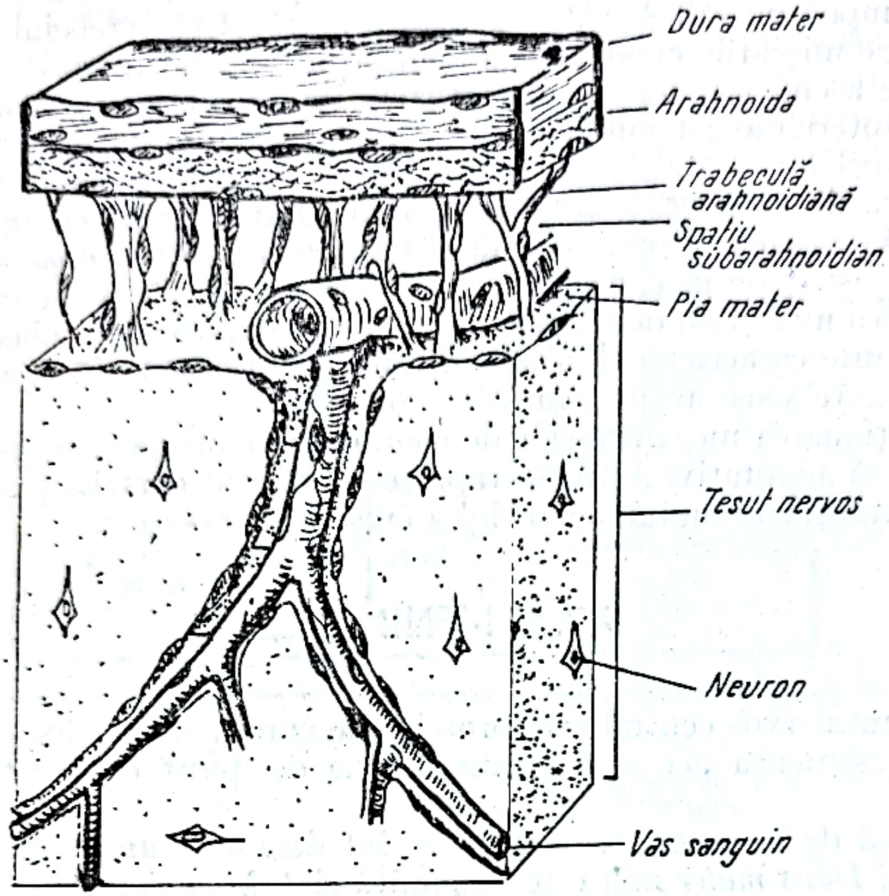


Fig. 9.74. — Reprezentarea schematică a meningelor (explicații în text).

care se cufundă în sinusurile venoase din dura mater. Aceste protruziuni, care conțin trabecule în centrul lor, sînt denumite *vili arahnoizi*. Funcția lor este de a transfera lichidul cefalorahidian în sîngele sinusurilor venoase.

9.7.5.3. Pia mater

Pia mater conține numeroase vase sanguine și este în strînsă asociație cu țesutul nervos, dar nu se află în contact cu celulele nervoase sau cu fibrele nervoase. Între pia mater și elementele nervoase se află un strat fin de prelungiri gliale, atașat ferm de pia mater. Pia mater urmează toate neregularitățile suprafeței sistemului nervos central și pătrunde în acestea pe o oarecare întindere, în lungul vaselor. Ea este acoperită de celule turtite (scuamoase) de origine mezenchimală.

9.7.6. VASCULARIZAȚIA SISTEMULUI NERVOS CENTRAL

Vasele sanguine pătrund în sistemul nervos central prin tuneluri acoperite de *pia mater*, denumite spații perivasculare. *Pia mater* dispare înainte ca

Scanned with OKEN Scanner

vasele sanguine să se capilarizeze. La om și la alte organisme superioare, viața depinde de homeostazie, adică de menținerea constantă a mediului intern. Nicăieri această dependență nu este mai mare ca în creier. În restul corpului concentrația extracelulară a hormonilor, aminoacizilor și ionilor — cum este cazul potasiului —, suferă frecvente fluctuații mici, îndeosebi după mese sau după eforturi. Dacă creierul ar fi expus unor astfel de fluctuații, consecința ar fi o activitate nervoasă necontrolată, deoarece unii hormoni și aminoacizi servesc și ca neurotransmițători iar ionul de potasiu influențează pragul excitabilității celulelor nervoase. De aceea, creierul, spre deosebire de alte organe din corp, trebuie izolat de aceste fluctuații tranzitorii. Pentru a exercita un control foarte sever al concentrației mediului intercelular, capilarele sanguine care irigă SNC au o structură specială. Celulele capilarelor sanguine din sistemul nervos, spre deosebire de alte capilare, formează un perete continuu care împidică multe substanțe să treacă din patul sanguin în spațiul intercelular nervos. Peretele capilar neîntrerupt constituie substratul morfologic al așa-numitei *bariere hematoencefalice*, a cărei existență a fost presupusă încă de la începutul acestui secol și demonstrată indubitabil, cu ajutorul microscopului electronic, în cursul anilor 1960. Deosebind creierul de alte organe, bariera îndeplinește o funcție critică. Dacă izolarea ar fi completă, creierul ar muri din lipsă de substanțe nutritive. Din fericire, substanțele nutritive traversează bariera hematoencefalică cu ușurință, datorită unor sisteme de transport care recunosc moleculele trebuincioase și le transportă în creier. În ultimii ani s-a învățat mult referitor la mecanismele de transport.

9.7.6.1. Conceptul de barieră hematoencefalică

Supoziția referitoare la existența unei bariere speciale între sistemul circulator și fluidul intercelular din sistemul nervos își are originea în observația (făcută la începutul secolului de P. Ehrlich și E. Goldmann), că unii coloranți injectați în sînge colorează numeroase celule din corp, nu însă și celulele nervoase. Inițial, rolul de barieră a fost atribuit la două structuri speciale care alcătuiesc pereții capilarelor vasculare cerebrale: *a)* celulele endoteliului capilar și *b)* ale lamei formată de picioruşele astrocitare în jurul vaselor, inclusiv al capilarelor (fig. 9.75 A și B). Cercetări mai recente de microscopie electronică au arătat că anumite molecule trasoare (ca peroxidaza de hrean și ferocianida), injectate în lichidul cefalorahidian, pot pătrunde prin spațiile intercelulare ale sistemului nervos, inclusiv printre picioruşele astrogliale, și pot ajunge la suprafața externă a celulelor endoteliilor capilare. Dimpotrivă, dacă sînt injectate în sînge, ele rămîn în capilare. În consecință, se poate trage concluzia că *celulele endoteliale* constituie bariera principală a deplasării acestor molecule din sînge în spațiul interneuronal. Principalele particularități morfologice ale endoteliilor capilarelor din sistemul nervos, care constituie substratul ultrastructural al barierei sînt: *a)* joncțiunile strînse dintre celulele endoteliale care formează o barieră continuă și *b)* absența sau numărul foarte redus al veziculelor transportoare (a caveolelor) din aceste celule endoteliale.

Trebuie notat că există în creier șase sau șapte mici zone în care endoteliile capilarelor vasculare prezintă totuși discontinuități sau canale (nu for-

Scanned with OKEN Scanner

mează bariere hematoencefalice ca în restul creierului) care permit substanțelor din sînge să ajungă în spațiul intercelular parenchimatos. Printre zonele fără barieră hematoencefalică se află glanda pineală, glanda pituitară (inclusiv lobul nervos și tija) și unele zone din hipotalamus. Absența barierei în aceste zone lasă deschisă calea hormonilor care circulă în sînge (inclusiv cei

Fig. 9.75. — Imagine microscopică a plexurilor coroide: numeroase falduri vasculo-conjunctive sînt acoperite de un epiteliu simplu cuboid (colorație HE).

secretați în regiunile respective) să vină în contact cu neuronii endocrini din creier, închizînd astfel lanțul care constituie substratul reglării prin *feed back* a sistemului neuroendocrin.

Bariera hematoencefalică se alterează prin apariția a numeroase caveole în celulele endoteliale (din capilare, arteriole și venulele cerebrale) în ischemiile cerebrale consecutive șocurilor, hipertensiunii sau diferitelor traume cerebrale. Cercetările experimentale au dovedit că alterările barierei hematoencefalice (apariția caveolelor) apar mai întîi în celulele endoteliale ale arteriolelor și ulterior în endoteliile capilare.

9.7.6.2. Cum traversează substanțele nutritive bariera hematoencefalică ?

Odată dovedit faptul că celulele endoteliale constituie baza morfologică a barierei hematoencefalice, este necesar să se elucideze mecanismele prin care moleculele necesare metabolismului cerebral traversează bariera. Primul pas în această direcție este determinarea substanțelor capabile să traverseze bariera și a celor care sînt blocate. În acest scop au fost utilizate mole-

Scanned with OKEN Scanner

culele trasoare marcate radioactiv. Pe această cale s-a putut stabili că anumite proprietăți chimice condiționează capacitatea moleculelor de a pătrunde în parenchimul nervos.

S-a constatat că *solubilitatea lipidică* este factorul cel mai important pentru ca o substanță să traverseze bariera hematoencefalică. Moleculele solubile în lipide străbat cu ușurință bariera și pătrund în creier. Între aceste molecule se află nicotina, etanolul și heroina, fapt ce ne permite să înțelegem de ce aceste substanțe sînt atît de dăunătoare cînd se abuzează de ele. De asemenea compușii greu solubili în lipide, cum sînt cei cu azot cuaternar de tipul curarei, nu pot traversa ușor bariera endotelială, în vreme ce substanțele cu azot terțiar ca beta-eritroidina, se dizolvă în membranele celulelor endoteliale și pot străbate bariera, pentru a acționa asupra sinapselor nervoase.

Pentru a funcționa, creierul are nevoie de substanțe nutritive care nu sînt solubile în lipidele membranelor plasmatice endoteliale. Așa este cazul glucozei, care constituie principala sursă de energie a celulelor cerebrale, precum și al unor aminoacizi care nu pot fi sintetizați de neuroni. Întrucît acestea nu sînt solubile în lipide, ele nu pot traversa bariera prin simplă difuzie. Fiecare substanță nutritivă esențială trebuie să fie recunoscută și trebuie să traverseze membranele endoteliale cu ajutorul *transportorilor specifici pentru moleculele nutritive.*

Principiul specificității a fost mai întîi stabilit pentru glucoză. De la început s-a constatat că țesutul nervos extrage din capilarele sanguine o mare cantitate de D-glucoză și nu extrage L-glucoza (în mușchi cei doi izomeri pătrund în mod egal). Pe această bază s-a putut trage concluzia că celulele endoteliilor capilarelor cerebrale conțin un sistem de transportori transmembranari foarte specifici pentru D-glucoză. În continuare, s-a constatat că (așa ca și în celulele sanguine) transportul glucozei în creier crește odată cu concentrația glucozei în serul sanguin, dar numai pînă la un anumit nivel. Peste un nivel maxim, rata transportului se închide și astfel sistemul este denumit saturabil. Cercetările pe capilarele cerebrale izolate au confirmat ipoteza că D-glucoza pătrunde în celulele endoteliale prin membranele de pe fața luminală (sanguină) și le părăsesc prin membrana feței antiluminale (cerebrală). Fiecare celulă endotelială cerebrală conține foarte multe complexe transportoare de glucoză, iar fiecare transportor este alcătuit din proteine transmembranare care formează canale hidrofile, pentru ca glucoza să poată trece prin bistratele lipidice ale membranelor plasmatice endoteliale.

Transportul aminoacizilor prin barieră constituie o problemă mai complexă, deoarece (spre deosebire de glucoză, care este singurul compus din clasa sa în sînge) este vorba de o clasă diversă de molecule organice. Aminoacizii pot fi sistematizați în patru clase care se comportă diferit față de bariera hematoencefalică: aminoacizi neutri mari, neutri mici, bazici și acizi.

Deosebirile în comportarea aminoacizilor neutri mari față de aminoacizii neutri mici dovedesc complexitatea sistemului care transportă aminoacizii prin bariera cerebrală. Aminoacizii neutri mari prezintă o importanță specială, deoarece sînt necesari în creier pentru sinteza atît a neurotransmițătorilor, cît și a proteinelor neuronale.

Au fost identificate două sisteme transportoare ale aminoacizilor: unul specific pentru aminoacizii neutri mari iar celălalt pentru moleculele bazice și acide. În cazul aminoacizilor neutri mari, cel puțin 10 din ei concură pen-

Scanned with OKEN Scanner

tru a traversa celulele endoteliale cerebrale prin același mecanism de transport. Ca și pentru glucoză, transportorii pentru aminoacizii neutri mari sînt prezenți atît pe membrana luminală cît și pe cea antiluminală, fiind astfel capabili să transporte acești aminoacizi esențiali prin endoteliul cerebral. În concluzie, atît glucoza cît și aminoacizii neutri mari traversează peretele endoteliilor capilarelor cerebrale cu ajutorul unor sisteme transportoare specifice, care funcționează însă fără consum de energie datorită difuziei osmotice.

Aminoacizii neutri mici, pe de o parte, nu sînt transportați de bariera sanguină. Aceasta nu este surprinzător deoarece micile molecule pot fi sintetizate de neuroni și acești aminoacizi nu sînt „esențiali". Mai mult, cel puțin un membru al acestui grup — glicina — este un puternic inhibitor al neurotransmițătorilor și concentrația sa trebuie menținută la un nivel mai scăzut în fluidul interneuronal decît în sînge. În acest caz proteinele transportoare au un rol esențial în realizarea unui *transport asimetric* care se face de această dată cu cheltuială de energie. Astfel micii aminoacizi neutri, cum este glicina, precum și potasiul sînt extrași din spațiile interneuronale și trimiși în patul sanguin. Ei sînt pompați afară din lichidul interstițial cu ajutorul unor transportori activi, care sînt prezenți în membrana antiluminală a celulei endoteliale capilare cerebrale. Pătrunderea glicinei în celula endotelială este cuplată cu cea a sodiului pentru că necesită energie. Energia pentru transportul potasiului se face prin degradarea ATP de către ATP-ază; sodiul este pompat simultan în creier. În continuare, glicina părăsește endoteliul capilar și pătrunde în patul sanguin pe calea transportorilor de aminoacizi neutri mari.

În sfîrșit, o altă caracteristică a endoteliilor barierei encefalice este *prezența receptorului de transferină* (acest receptor nu a mai fost găsit în nici un alt endoteliu capilar). Receptorul de transferină a mai fost identificat prin imunocitochimie și în oligodendrocite. Cercetările recente efectuate prin administrarea intravasculară a transferului marcată cu ^{125}I au permis identificarea substanței mai întîi în celulele endoteliale cerebrale (la 3—5 minute de la injectare) și ulterior în celulele nevroglice (la 5—10 minute de la injectare). Apariția substanței în celulele nevroglice este însoțită de reducerea radioactivității în celulele endoteliale. De asemenea efectuarea perfuziei la o temperatură scăzută (la 18°) reduce cu 95% captarea transferinei de către substanța nervoasă. Aceste experiențe dovedesc că: *a*) transferina (respectiv fierul organic) este transportată prin bariera hematoencefalică; *b*) receptorul de transferină din celulele endoteliale este reciclat și *c*) el funcționează numai în condițiile menținerii integrității barierei hematoencefalice.

9.7.6.3. Implicațiile medicale

Din punctul de vedere al clinicianului, problema fundamentală, reprezentată de bariera hematoencefalică, este cea a transportului agenților terapeutici în creier, în scopul tratării afecțiunilor țesutului nervos. Unele droguri—de exemplu cloramfenicolul (un antibiotic) — sînt foarte solubile în lipide și astfel pătrund ușor în creier. Majoritatea, totuși, inclusiv unele esențiale ca penicilina, sînt foarte puțin solubile în lipide și pătrund foarte încet în creier sau chiar deloc. Din fericire penicilina este foarte puțin toxică și în concentrații foarte mari poate compensa slaba solubilitate în lipide. Cu toate acestea, cei mai mulți produși terapeutici nu pot fi administrați în doze mari, cu riscuri minime. Cer-

Scanned with OKEN Scanner

cetările în scopul găsirii unui mod de administrare eficient a drogurilor în afecțiunile nervoase se bazează pe două strategii. Fie permeabilitatea barierei hematoencefalice este scăzută temporar, pentru a se lăsa traversată de droguri, fie este ocolită într-un fel. Una din căile practice utile în cadrul primei strategii se dovedește a fi administrarea medicamentelor (inclusiv a citostaticelor) în soluții hiperosmotice. Cea de a doua (cea a ocolirii barierei) este practicată de mai mult timp și constă în introducerea medicamentelor în lichidul cefalorahidian.

Unele droguri pot fi *modificate în creier*. Astfel heroina și morfina sînt foarte asemănătoare ca structură; singura diferență constă în aceea că molecula de heroină are două grupări acetil (CH_3CO) atașate în poziția în care molecula de morfină are un hidroxil (OH). Grupările acetil conferă heroinei o mare solubilitate în lipide; morfina este greu solubilă în lipide. În consecință, heroina pătrunde în creier mult mai ușor decît morfina. Odată heroina pătrunsă în creier, grupările acetil sînt excizate enzimatic și este transformată în morfină. Aceasta ar putea fi o cale practică de exploatat de către farmacologi pentru alte medicamente.

Aceste principii, ca și altele, sugerează că progresele recente în studiul barierei hematoencefalice vor avea importante aplicații clinice. Probabil cea mai mare importanță a cercetărilor de pînă acum constă nu în aplicațiile lor practice, ci în satisfacția de a pătrunde adînc în înțelegerea unui fenomen biologic fundamental.

9.7.6.4. Fluxul sanguin și activitatea cerebrală

Este binecunoscut faptul că activitatea funcțională a unui țesut se află în relație strînsă cu capacitatea sa de a capta oxigenul din patul sanguin. Aceasta, pentru că numărul de molecule de ATP regenerate de o anumită celulă se află în raport constant cu numărul de molecule de oxigen captate. Astfel în timpul unei activități musculare intense, fluxul sanguin prin țesutul muscular poate crește de circa 20 de ori față de nivelul de repaus. De asemenea, fluxul sanguin în alte organe se adaptează în permanență la variațiile cererii de oxigen în organele respective.

În cazul creierului, interrelația între activitatea funcțională și fluxul sanguin a fost sugerată încă din 1980 de C. Roy și C. Sherrington, care au observat că la cîteva secunde după declanșarea unui acces epileptic (o hiperactivitate sincronizată a celulelor cerebrale reflectată prin convulsii musculare), apare o tumefiere a creierului, ceea ce sugerează că are loc o creștere maximă a aportului de sînge.

Cercetările ulterioare au arătat că metabolismul cerebral și fluxul sanguin sînt intensificate în cursul activității normale a diferitelor regiuni ale cortexului cerebral implicate în diferite activități. Încă din 1937 Schmidt și Hendrix au înregistrat o creștere a fluxului sanguin strict localizată în cortexul vizual al pisicii, ca urmare a acțiunii unei pete de lumină pe retina pisicii. Numeroase alte exemple de creștere localizată a fluxului sanguin cerebral au fost raportate ulterior atît la om cît și la animale.

Ca urmare, s-a conturat părerea că în cursul testelor asupra unor funcții cerebrale speciale se petrec schimbări locale în activitatea celulelor ner-

Scanned with OKEN Scanner

voase şi o intensificare a metabolismului lor care antrenează o creştere a fluxului sanguin în regiunea respectivă. Această concluzie a sugerat că este posibilă localizarea funcţiilor cerebrale prin studierea fluxului local sanguin.

Determinarea aproximativă a fluxului sanguin în creierul uman a fost făcută de S. Kety (1944); el a evaluat-o la circa 50 ml de sînge/100 g creier/minut. De asemenea consumul mediu de oxigen este de 3,5 ml oxigen/100 g ţesut/minut.

În cursul anilor '60 şi '70, cercetători danezi şi suedezi (Lassen, Ingvar, Skinhoi şi alţii) au măsurat fluxul sanguin în regiuni bine delimitate din creierul uman intact cu ajutorul izotopilor radioactivi (a fost utilizat xenonul 133 — un radioizotop al gazului inert xenon). Ei au stabilit că fluxul sanguin în creierul subiecţilor normali este foarte caracteristic şi reproductibil. Acesta poate servi ca punct de plecare pentru interpretarea unor modificări înregistrate în cursul diferitelor stări funcţionale de tip senzorial, motor sau al unor activităţi pur mintale. În mod surprinzător, atunci cînd subiecţii se află *în stare de repaus şi treji* (în stare confortabilă culcat pe spate, cu ochii închişi, într-un laborator liniştit, fără să vorbească şi fără emoţii) *fluxul sanguin prin cortex nu este uniform*. Dimpotrivă, fluxul sanguin este în toate cazurile semnificativ mai mare în regiunea frontală a cortexului decît în regiunile centrală şi posterioară. Deşi, aşa cum s-a menţionat, fluxul mediu cerebral la subiecţii normali este de 50 ml/100 g/1 minut, fluxul sanguin în regiunea frontală a cortexului este cu 20—30% peste această medie, în timp ce fluxul în regiunea posterioară, în mod special în unele părţi ale lobilor temporali, este corespunzător mai scăzut. Întrucît densitatea capilarelor sanguine şi a celulelor nervoase în diferitele regiuni ale cortexului este aproximativ egală, se poate conchide că *în stare de repaus nivelul activităţii în regiunea cerebrală frontală este cu circa 50% superioară regiunii posterioare.*

Acest „hiperflux" frontal în stare de repaus contribuie la înţelegerea stării de veghe conştiente. Se ştie că zona prefrontală (extremitatea anterioară a lobului frontal) este responsabilă de organizarea comportamentului în sensul cel mai larg, în timp ce restul regiunilor cortexului deservesc funcţiile motorii şi pe cele senzoriale. Astfel „hiperfluxul" frontal în repaus sugerează că în stare de veghe conştientă creierul este ocupat cu elaborarea şi selectarea diferitelor modele de comportare. Tot în stare de veghe regiunile motorii şi senzoriale ale cortexului nu sînt foarte active. Această interpretare este în acord cu experienţa subiectivă. În timp ce sîntem în repaus, nu rămînem în permanenţă receptivi la excitaţiile senzoriale; numai ocazional percepem distinct semnalele vizuale, auditorii sau tactile care „difuzează" pe fondul stării de repaus. Cea mai mare parte a stării noastre de repaus este concentrată pe gîndurile interioare, în mod special pe reflexiile asupra propriei situaţii, a relaţiilor noastre cu evenimentele petrecute, precum şi cu proiectele de viitor. Altfel spus, conştiinţa cerebrală de repaus este angajată în principal în simularea comportamentului.

După ce am reţinut caracteristica circulaţiei cerebrale în stare de repaus, în continuare, se pune întrebarea, care este efectul unor stimuli senzoriali simpli asupra circulaţiei regionale cerebrale?

Experienţele au arătat că fiecare tip de *stimul senzorial* (vizual, auditiv sau tactil) *activează circulaţia sanguină atît în cortexul senzorial primar cît şi în aria adiacentă asociată zonei senzoriale* specifice stimulului respectiv.

Scanned with OKEN Scanner

Așa de exemplu, cînd un subiect aflat în stare de repaus deschide brusc ochii și privește un obiect precis, se poate înregistra o creștere dramatică (cu circa 20%) a fluxului sanguin și în ariile corticale vizuale *asociate*, localizate în lobii temporali și occipital, irigate de carotidă (cortexul vizual primar este localizat în profunzimea lobului occipital și irigat de artera vertebrală). Activarea circulației sanguine și în ariile asociate zonelor la care sosesc stimulii senzoriali specifici, sugerează că o formă de memorie specifică ar putea fi localizată în aceste arii corticale, asociate cu zonele senzoriale primare. În adevăr, realizarea acestor teste senzoriale simple implică un anumit fel de memorizare: impulsurile senzoriale care precedă sosirea unui impuls într-un moment dat, trebuie reținute și impulsurile cumulate trebuie comparate cu experiența premergătoare. Acest proces implică asocieri în care memoria joacă un rol-cheie.

Cercetările privitoare la circulația sanguină cerebrală în cursul unor procese mai complexe, cum este cazul *mișcărilor musculare voluntare*, inclusiv cele ale vorbirii, au scos în evidență: *a)* importanța funcțională a organizării ariilor somatosenzoriale primare și a celei motorii ca două benzi adiacente, extinsă pe toată suprafața emisferelor, de la o ureche la cealaltă și *b)* implicarea cortexului premotor superior, inclusiv a ariei motorii suplimentare, în planificarea secvențelor mișcărilor motorii. Așadar, cercetările respective sugerează că *aria suplimentară motorie este programatorul dinamicii mișcărilor*, în vreme ce cortexul senzorial primar este controlorul iar *cortexul motor primar este executorul* acestor programe. Dar nu numai atît, în procese foarte complexe, ca vorbirea, sînt activate simultan șapte regiuni corticale, care formează o figură asemănătoare literei „Z" pe suprafața fiecărei emisfere. Această constatare dovedește că procesele comportamentale complexe nu sînt de fapt localizate ci răspîndite pe suprafața cerebrală și contribuția fiecărei zone corticale la funcționarea întregului sistem este foarte specifică.

În sfîrșit, studiile privitoare la diferitele forme de activare cerebrală au permis să se constate că *indivizii aflați în stare de veghe conștientă prezintă nu numai o creștere locală a fluxului sanguin* în regiuni specifice ale cortexului, *ci, de asemenea o creștere a fluxului sanguin al creierului în totalitate*. Astfel, testele simple de rememorare sau de judecată de rutină produc, pe lîngă schimbări locale, și o creștere generală a fluxului sanguin cerebral cu circa 10%. Aceasta pare să fie în raport cu efortul depus de subiect pentru rezolvarea unei anumite probleme (creșterea poate fi minimă dacă problema este de rutină și mare, dacă problema este dificilă).

Această descoperire reprezintă un suport pentru distincția pe care o fac neurofiziologii între căile cerebrale specifice și nespecifice. Căile motorii și senzoriale *specifice* pleacă sau sosesc la regiuni corticale bine definite, care devin active în timpul primirii sau interpretării mesajului senzitiv specific sau în timpul executării unei dispoziții motorii specifice. În același timp, solicitarea unei reacții atrage după sine activarea unor zone corticale mai largi, pe calea căii *difuze* care este inițiată din afară, de la nivelul formațiunii reticulare a trunchiului cerebral și la nivelul talamusului din creierul intermediar. Așadar, rezultă că pentru ca creierul să poată „înțelege" lumea înconjurătoare, pentru a percepe semnificațiile și pentru a lua decizii în cazuri dificile, cortexul cerebral trebuie să fie activat nu numai local ci și total. Aceste observații constituie un sprijin pentru ipoteza că activarea generală a creierului

Scanned with OKEN Scanner

este însoțită nu numai de o creștere simplă a activității electroencefalografice ci, de asemenea, de o creștere atît a fluxului sanguin cît și a captării oxigenului.

În prezent sînt în curs de aplicare tehnici complexe care vor permite cunoașterea la nivel microscopic a circulației regionale, a metabolismului celular al creierului uman — cel mai complex sistem biologic.

9.7.7. PLEXURILE COROIDE ȘI LICHIDUL CEREBROSPINAL

9.7.7.1. Plexurile coroide (Tela coroidea)

Plexurile coroide (tela coroidea) constau din invaginații sub formă de pliuri sau de deget de mănușă ale piei mater, care pătrund în ventriculii al III-lea sau al IV-lea și, parțial, în pereții ventriculilor laterali (vezi fig. 9.65 și fig. 9.75).

Plexurile coroide sînt alcătuite din *țesutul conjunctiv* al piei mater, acoperit de *celule cuboide* sau *cilindrice* secunde care provin din tubul neural. La polul lor apical, celulele epiteliale prezintă numeroși microvili neregulați care se termină prin dilatații în măciucă. Citoplasma lor este bogată în mitocondrii și prezintă complexe joncționale sub polul apical.

Țesutul conjunctiv al plexurilor coroide este bogat în celule conținînd numeroase macrofage. Endoteliul capilarelor sale este fenestrat, cu diafragme care închid porii. Celulele endoteliale sînt legate prin joncțiuni strînse. Celulele epiteliale și celulele endoteliale formează așa-numita barieră *sînge-lichid cerebrospinal*, care este responsabilă de diferența de compoziție dintre plasma sanguină și lichidul cefalorahidian.

Principala funcție a plexurilor coroide este aceea de a secreta lichidul cefalorahidian, un lichid bogat în apă, secretat activ de celulele epiteliale care acoperă plexurile. În plexuri există și puține celule absorbtive.

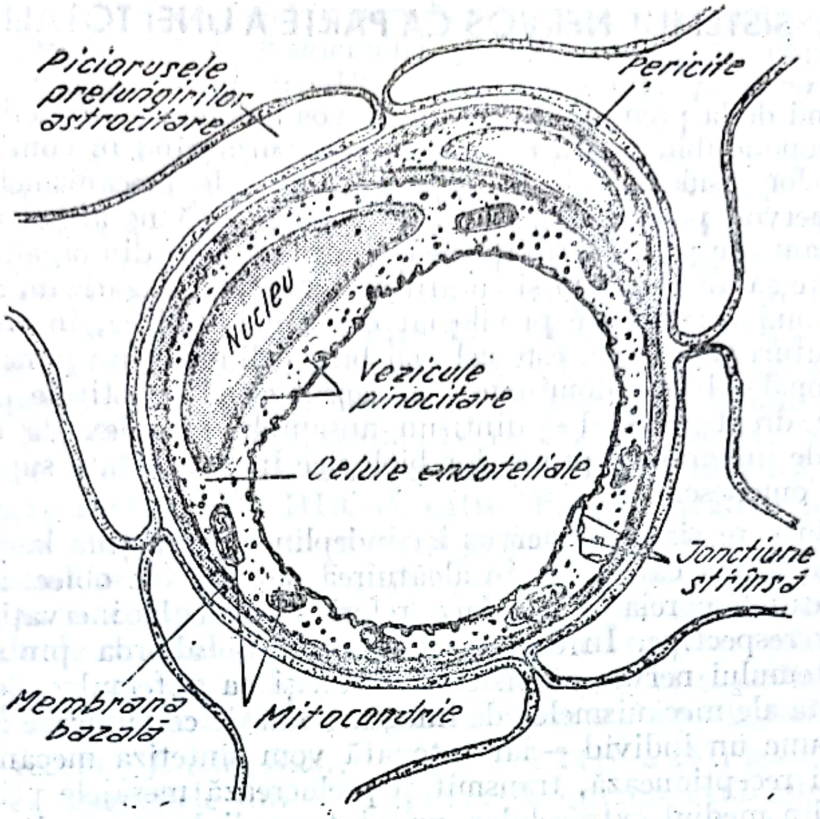
9.7.7.2. Lichidul cerebrospinal

Acest lichid elaborat de plexurile coroide, conține un mic procent de substanțe organice și umple complet ventriculii, canalele centrale ale măduvei, spațiile subarahnoidiene și spațiile perivasculare. Lichidul este important pentru metabolismul sistemului nervos central și constituie un mecanism de protecție, pentru că realizează un strat lichid în spațiile subarahnoide, strat care protejează țesutul nervos contra traumelor.

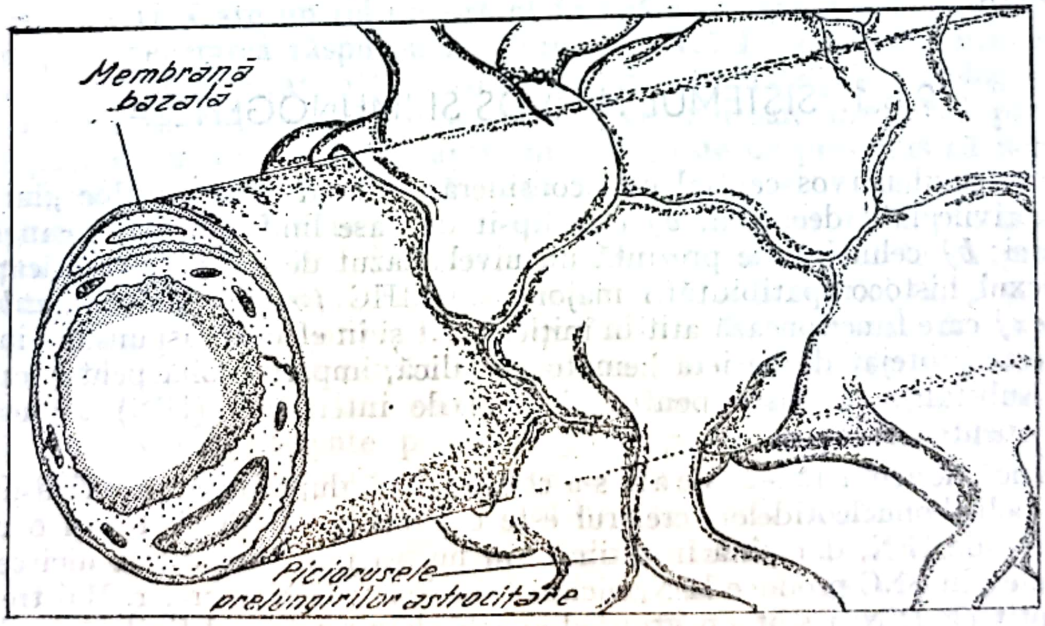
Adultul are circa 100 ml de lichid cefalorahidian. Fluidul este clar, are densitate mică (1 004—1 008), un foarte scăzut conținut de proteine și o concentrație relativ ridicată de Na, K și Cl, precum și puține celule descuamate și 2—5 limfocite pe ml.

Lichidul cefalorahidian este produs continuu, cu un flux de pătrundere în arahnoidă de pînă la 200 ml/zi (în cazul unor leziuni). Substanțele care ajung în lichidul cefalorahiaian trebuie să traverseze celulele plexurilor coroide.

Scanned with OKEN Scanner



A



B

Fig. 9.76. — A şi B. — Picioruşele prelungirilor astrocitelor înconjură aproape complet capilarele sanguine cerebrale.

Lichidul cefalorahidian circulă prin sistemul nervos central şi este absorbit de venele din jurul ţesutului nervos. Ţesutul nervos este complet lipsit de vase limfatice.

Scanned with OKEN Scanner

9.8. SISTEMUL NERVOS CA PARTE A UNEI TOTALITĂȚI

Pornind de la premisa că țesutul nervos îndeplinește funcția de excitabilitate și conductibilitate în corpul omenesc, urmărind în continuare clarificarea bazelor tisulare, celulare și moleculare ale mecanismelor biologiei sistemului nervos, putem ușor ajunge la concluzia că ne aflăm în fața unui țesut dominant sau privilegiat față de celelalte țesuturi din organismul uman. Ar fi o eroare să absolutizăm și cu atît mai mult să vulgarizăm această concluzie. Sistemul nervos este privilegiat doar în sensul că, în comparație cu celelalte țesuturi și sisteme, este cel mai bine delimitat din punct de vedere morfofuncțional; el este dominator, în sensul că el constituie doar un element — este drept esențial — dintr-un ansamblu complex de elemente și mecanisme de integrare a proceselor biologice într-o unitate superioară care este corpul omenesc.

Felul în care sistemul nervos își îndeplinește funcțiile la nivelul unui aparat sau al altuia care intră în alcătuirea omului, fac obiectul histologiei speciale, în cadrul căreia se vor face referi speciale la inervația organelor și aparatelor respective. În cele ce urmează vom aborda problema interrelațiilor sistemului nervos cu sistemul imun și cu sistemul endocrin — alte două elemente ale mecanismelor de integrare sau de comunicare intertisulară de care dispune un individ — iar totodată vom sintetiza mecanismele prin care neuronii recepționează, transmit și prelucrează mesajele primite la suprafața lor din mediul extracelular, prin intermediul unor molecule produse de alte tipuri de țesuturi (de exemplu, factorii de creștere, hormonii, electroliții etc.).

9.8.1. SISTEMUL NERVOS ȘI IMUNOGENEZA

Sistemul nervos central este considerat în mod clasic un loc „imunologic privilegiat" deoarece: *a)* este lipsit de vase limfatice și de ganglioni limfatici; *b)* celulele sale prezintă un nivel scăzut de antigeni codificați de complexul histocompatibilității majore sau MHC *(major histocompatibility complex)* care funcționează atît în inițierea cît și în efectul răspunsului imun; și *c)* este protejat de bariera hematoencefalică, impermeabilă pentru numeroase substanțe, inclusiv pentru tipurile de interferon (IFN) cunoscute (adică pentru IFN α, β și γ).

Încă de acum 15—20 de ani s-a constatat că după injectarea virusurilor sau a poliribonucleotidelor, creierul este capabil să producă totuși o mare cantitate de IFN, dar pînă în ultimii ani nu s-a putut identifica nici ce tip de celule din SNC produce IFN, nici ce funcție are IFN în creier. Mai trebuie reamintit că IFN-ii sînt un grup eterogen de proteine, definite în general prin capacitatea lor de a proteja celulele contra infecției virale. Au fost descoperite trei clase de IFN, care sînt produsele primare a trei tipuri de celule: IFNα — produs de leucocite, IFN β — de fibroblaste și IFN γ — de limfocite. Cercetări recente au dovedit că IFN γ, o limfokină a celulelor T, induce o creștere dramatică în expresia antigenelor MHC pe celulele mieloide umane normale și leucemice, pe celulele liniei neurale și pe celulele cerebrale atît

Scanned with OKEN Scanner

in vivo cît și *in vitro*. Principalele tipuri de celule din creier, inclusiv neuronii, astrocitele, oligodendrocitele și microglia, prezintă o expresie mărită a MHC ca răspuns la IFG γ (*Nature*, *310*, 1984, 688—691; *J. Neuroimmunol.*, 1985, 7, 255—278).

La șoarece, MHC, denumit H-2, codifică o diversitate de glicoproteine ale suprafeței celulare implicate în răspunsul imun. Se pot deosebi două grupe de molecule: grupa I cuprinde antigenii de transplantare (H-2 K, D și L) și sînt prezenți pe cele mai multe tipuri de celule din organism, însă nedectabili pe celulele nervoase normale. Antigenii H_2 mediază reacția imună față de limfocitele citotoxice T. Grupa II, sau antigenii răspunsului imun asociat (Ia), se găsesc în principal pe limfocitele B, pe macrofage și pe celulele dendritice, pentru a interveni în prezentarea antigenilor străini limfocitelor T reglatorii. S-a raportat că aproximativ 1—2% din celulele SNC sînt Ia-pozitive, însă natura și originea acestor celule nu a fost stabilită decît foarte recent. Modularea antigenilor MHC de către IFN γ pe neuroni și/sau pe nevroglii pot face apte celulele imunoincompetente din creier, să participe la răspunsul mediat de limfocitele T și pot juca un rol important în bolile creierului care au o componentă imunologică. Oricum, această cooperare a celulelor cerebrale cu celulele imune pare să implice trecerea celulelor T prin bariera hematoencefalică, astfel încît ele intră în creier și elaborează limfokine de tipul IFN γ care în mod normal nu poate traversa bariera.

Foarte recent (*J. cell. Biol.*, 1986, *102*, 2 244—2 253) s-au adus dovezi concludente că astrocitele din SNC produc interferon care este biologic și antigenic similar cu IFN α/β. IFN astrocitar este un inductor potențial al expresiei antigenului H-2 pe o subpopulație de astrocite. Aceste rezultate sugerează că IFN are un rol important în apărarea creierului contra virusurilor și în generarea răspunsului imun în SNC. De exemplu, limfocitele citotoxice T sînt implicate activ în unele leziuni cerebrale și în patologia unor infecții virale ale creierului. Deoarece celulele normale din SNC prezintă foarte puțini sau sînt lipsite de antigeni MHC, este de presupus că neuronii cerebrali infectați cu viruși pot să scape recunoașterii și distrugerii de către limfocitele citotoxice T, care pot recunoaște antigenii virali numai în asociație cu antigenii celulari MHC. Întrucît celulele SNC sînt capabile să producă antigeni MHC ca răspuns la IFN și tipurile de IFN periferici (α, β și γ) nu par să poată străbate bariera hematoencefalică, IFN produs de astrocite joacă un rol important în răspunsul imun din SNC prin antrenarea apariției antigenilor MHC pe celulele cerebrale anterior imunologic incompetente, care acum devin competente pentru a participa la răspunsul imun mediat de limfocitele T. Acest mecanism ar putea sta la baza unor afecțiuni cum este scleroza multiplă, în care celulele T infiltrează SNC.

După cum s-a mai afirmat, creierul elaborează o mare cantitate de IFN cînd i se injectează virusuri sau poliribonucleotide. Se pare că producția de interferon este compartimentizată în creier. S-a demonstrat de exemplu, că pacienții decedați de encefalită St. Louis au interferon în lobul frontal, în cerebel și în ganglionii bazali, dar nu și în trunchiul cerebral. Diferențe însemnate în conținutul IFN au fost raportate și în diferitele zone cerebrale infectate cu encefalită ecvină. Este posibil ca astrocitele din diferite regiuni cerebrale să fie responsabile de compartimentizarea IFN observată în infecțiile SNC.

Scanned with OKEN Scanner

Întrucît s-a dovedit că există mai multe subclase de interferon—α/β, este posibil ca astrocitele să producă un subtip de IFN special, care nu mai este produs de alte celule din organism și acest fapt a întîrziat identificarea producției de interferon în creier.

S-a constatat că IFN-α/β și tratamentul astrocitelor cu IFN astrocitar conduce la dezorganizarea gliofilamentelor acide, iar tratamentul prelungit al neuronilor cu IFN astrocitar are drept consecință dezorganizarea neurofilamentelor celulelor nervoase. Aceste observații sugerează posibila implicație IFN-ului astrocitar în patogeneza spiralelor neurofibrilare și a plăcilor neuritice din maladiile Alzheimer și Parkinson.

În sfîrșit, s-a putut dovedi că astrocitele pot fi subdivizate, după capacitatea lor de a exprima antigenii H-2 ca urmare a tratamentului cu interferon, în astrocite H-2-pozitive și astrocite H-2-negative.

9.8.2. BAZELE MOLECULARE ALE COMUNICĂRII INTERCELULARE

Organismele superioare dispun de două căi principale de comunicare intercelulară: sistemul hormonal și sistemul nervos. Între cele două sisteme de celule există schimburi reciproce de mesageri chimici pe mai multe căi. Sistemul nervos acționează asupra sistemului endocrin atît pe calea sinapselor nervoase cît și pe cale neuroendocrină, cum este cazul factorilor de secreție (de eliberare) și altele. La rîndul său, sistemul endocrin acționează asupra sistemului nervos pe cale sanguină atît indirect (prin bariera hematoencefalică, cît și direct, prin capilarele vasculare cu pori, prezente în unele regiuni nervoase ca în hipotalamus, în neurohipofiză sau în epifiză.

În mod tradițional se consideră că principala diferență între cele două sisteme constă în suplețea cu care acționează. Neuronii trimit mesageri discreți unui set special de celule-țintă (mușchi, un anumit grup de glande sau alți neuroni). Pentru a trimite un mesaj, neuronul elaborează la nivelul unui dispozitiv special, la nivelul *sinapsei*, o substanță chimică denumită *neuromesager*, care este recepționată de o moleculă-*receptor* de pe membrana celulei-țintă.

Acțiunea hormonilor este mai puțin discretă. Glandele endocrine secretă hormonii în patul sanguin și fiecare grup de celule-țintă dispune de receptorii specifici prin intermediul cărora captează hormonii necesari din sînge și-i endocitează.

Astfel, neuronii acționează la distanțe scurte asupra unui set restrîns de celule; comunicarea neuronală se face în cîteva miimi de secundă. Spre deosebire de acestea, hormonii elaborați de o glandă acționează asupra unui anumit tip de celule, în principiu în oricare punct din organism s-ar afla; comunicarea hormonală poate să se efectueze după mai multe ore.

Cercetările recente au scos în evidență mai multe asemănări între cele două sisteme decît se bănuiau în trecut. Printre aceste asemănări trebuie reținut faptul că o mare parte din neuropeptidele descoperite în ultimii 10—15 ani în sistemul nervos sînt similare cu horomonii secretați de glandele cu secreție internă (vezi neurotransmițătorii). De asemenea efectul hormonilor asupra sistemului nervos s-a dovedit a fi cu mult mai complex decît s-a bănuit pînă de curînd. Un exemplu în acest sens îl oferă steroizii.

Scanned with OKEN Scanner

Steroizii pot influența schimbări în comportament. Există numeroase dovezi că hormonii steroizi acționează asupra diferitelor tipuri de țesuturi din organism, inclusiv asupra țesutului nervos, traversînd membrana celulară, legîndu-se de receptori intracitoplasmici și afectînd în ultimă instanță expresia genetică din nucleu. Cercetări recente (Majewska și colab. — *Science*, 1986, *232*, 1 004; Gold și colab. — *New Engl. J. Med.*, 1986, *314*, 1 329) atestă că hormonii steroizi pot acționa și asupra membranei neuronale, ceea ce răstoarnă concepția tradițională. Astfel s-a dovedit că unii metaboliți ai steroizilor inhibă sau deprimă funcția celulelor nervoase și că alți steroizi excită neuronii. Atrage atenția faptul că atît pentru acțiunea inhibitorie cît și pentru cea excitatorie, metaboliții steroidici par să interacționeze cu aceleași molecule receptoare din membrana neuronală, însă pe căi opuse.

Metaboliții steroidici *inhibitori*, ca 3,5-tetrahidrodeoxicorticosterona (THDOC) stimulează și sporesc efectul produs de neurotransmițătorul inhibitor normal, acidul gamma-amino-butiric (GABA). Acest efect este asemănător pentobarbitalului, și dacă sînt afectați mulți neuroni, rezultatul este deprimarea activității sistemului nervos central.

Spre deosebire de acestea, steroizii *excitatori* blochează efectul inhibitor normal al GABA. Atunci cînd celulele nervoase sînt puțin inhibate, ele devin mai excitabile. Deci, atît steroizii inhibitori cît și cei excitatori par să acționeze la nivelul aceluiași tip de receptor specific, receptorul $GABA_A$.

În esență, noile cercetări sugerează că, pe lîngă modul de acțiune cunoscut anterior, steroizii mai interacționează și cu receptorii membranei de suprafață, pentru a schimba rapid și direct excitabilitatea celulelor nervoase.

Probabil că noile achiziții (și anume că steroizii normali și metaboliții lor afectează direct excitabilitatea celulelor nervoase) au implicații și pentru pacienții cu un nivel anormal de steroizi circulanți.

Majewska și colab. au arătat că THDOC și un metabolit al progesteronului (hormon sexual) acționează ca barbituricele. În mod surprinzător, cei doi metaboliți steroizi sînt chiar mai puternici decît pentobarbitalul în inducerea efectului inhibitor al GABA. Acești cercetători consideră că atunci cînd nivelul steroizilor este crescut în sînge, ei cresc și în lichidul cefalorahidian, deoarece „creierul se comportă față de steroizi ca un burete". Steroizii sînt foarte solubili în membrana celulară și este probabil că ei străbat cu ușurință bariera hematoencefalică pentru a ajunge în l.c.r.

Este posibil să existe și alte căi prin care GABA și hormonii steroizi interacționează. Pe de o parte, după cum se știe, GABA inhibă producția de cortizon, blocînd CRH *(corticotropin-releasing hormone)*, elaborat de hipotalamus. Pe de altă parte, în afară de acțiunea directă asupra receptorilor pentru GABA de pe membrana plasmatică, hormonii steroizi pot produce și efecte inhibitorii indirecte asupra GABA, acționînd prin enzimele intramembranare.

În concluzie, cercetările recente sugerează că numeroase tulburări de comportament asociate cu stresul, cu ciclul menstrual și cu sarcina, pot fi puse în legătură cu efectele pe care steroizii și metaboliții lor le au asupra celulelor nervoase cerebrale.

Scanned with OKEN Scanner

9.8.2.1. Mecanismele de comunicare intraneuronală

9.8.2.1.1. Bazele moleculare ale acțiunii mesagerilor în neuroni

Semnalele externe care sosesc la neuroni (neurotransmițătorii, factorii de creștere, hormonii etc.) nu invadează interiorul celulei nervoase, ci sînt detectați de niște antene moleculare, și anume de *receptorii* din membrană (de natură glicoproteică), care primesc mesajele exterioare și acționează un lanț de reacții moleculare al căror rezultat final este reglarea sau modificarea unor procese metabolice etc. Principala barieră în fluxul informației primită de la *mesagerii externi* (sau mesagerii de ordinul I) este membrana plasmatică neuronală, care, printr-un mecanism de *transducție*, transformă semnalele externe în semnale interne ce vor fi transportate în citoplasmă pe calea „mesagerilor de ordinul II (fig. 9.77).

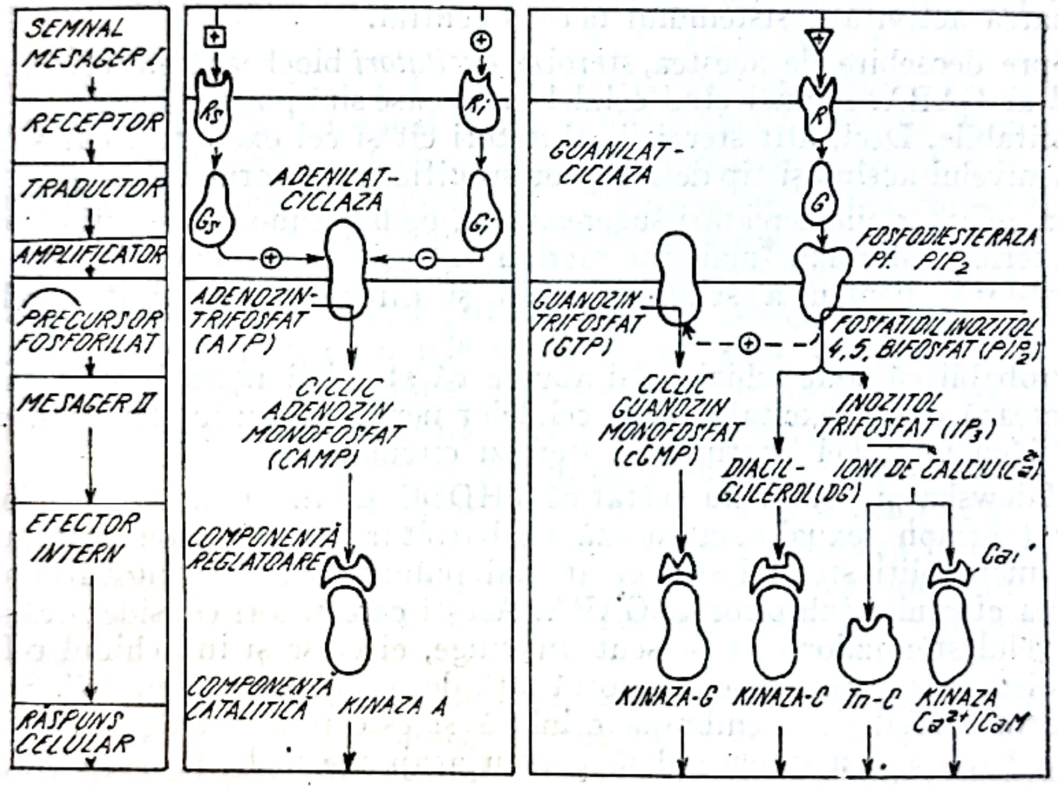


Fig. 9.77. — Principalele căi de transmitere a mesajelor de la receptorii din membrana celulară la efectorii intracelulari.

În termeni moleculari, procesul depinde de o serie de proteine din membrană. Fiecare dintre acestea transmit informația inducînd schimbări în conformația — o modificare în forma și, prin aceasta, în funcția — proteinelor vecine din lanț. La un anumit moment informația este transferată unor molecule mici sau chiar ionilor din citoplasmă. Aceste molecule mici se numesc *mesageri de ordinul* II și ele sînt capabile să difuzeze, pentru a transmite semnalul rapid în interiorul celulei.

Numărul mesagerilor de ordinul II este surprinzător de mic, iar căile de funcționare, comune în toate tipurile de celule din organism. Cunoașterea mecanismului de acțiune a acestor molecule are importanță fundamentală

Scanned with OKEN Scanner

pentru a înțelege felul cum este coordonată activitatea celulară. Se cunosc două căi principale de transmitere a semnalelor: una din aceste căi folosește AMP-ul ciclic ca mesager de ordinul II; cealaltă folosește o combinație de mesageri de ordinul II, și anume ionul de calciu și alte două substanțe — inozitoltrifosfatul (IP_3) și diacilglicerolul (DG). Ultimele două substanțe se formează pe o cale deosebită, respectiv prin degradarea fosfatidilinozitoldifosfatului (PIP_2), un fosfolipid minoritar din foița internă a stratului bilipidic plasmalemal.

Cele două căi au multe în comun. În ambele, componentul inițial, molecula *receptor* de la suprafața celulei, transmite informația prin membrana celulară în citoplasmă prin intermediul unei familii de *proteine G*; aceste proteine nu pot fi activate decît dacă se leagă de GTP. În ambele căi proteina G activează o *enzimă amplificator* de pe fața internă a membranei (adenilatciclaza pe calea AMPc, guanilatciclaza pe cea a GMPc și fosfodiesteraza pe cea a inozitolilor). Enzimele transformă moleculele precursoare în mesageri de ordinul II. De regulă precursorii sînt molecule bogate în grupări fosfat (ATP, GTP și inozitoldifosfat). De exemplu, amplificatorul adenilatciclazei transformă ATP în AMPc, în timp ce amplificatorul fosfolipazei C (sau fosfodiesteraza PIP_2) transformă fosfatidilinozitoldifosfatul (PIP_2 — lipidă din membrană) în DG și IP_3.

Mai mult, în ambele cazuri faza finală este similară — mesagerul de ordinul II induce schimbarea structurii unei proteine celulare (într-o conformație tridimensională proteina este inactivă; în cealaltă, ea contribuie la o activitate funcțională ca activarea unei căi metabolice, secreția, mișcarea etc.). Există două căi prin care mesagerul II funcționează. În una din ele mesagerul acționează direct. El se leagă de componenta reglatoare a proteinei și declanșează schimbări conformaționale. Un exemplu clasic îl constituie cazul mușchiului scheletal unde Ca^{2+} (mesagerul de ordinul II) se leagă de troponina C și declanșează contracția musculară (în celelalte forme de mișcare, Ca^{2+} se leagă de calmodulină). Calea alternativă este un mecanism mai comun pe care-l întîlnim și în celula nervoasă, mesagerul II acționează indirect: el activează o enzimă denumită *proteinkinază* care fosforilează proteinele su bstrat din citoplasmă. În fazele finale, principalele căi (inclusiv calea AMPc) utilizează încă un mesager, și anume *ionul de* Ca^{2+}. Aceasta este principala cale utilizată de majoritatea celulelor, inclusiv de celula nervoasă. În ultimă instanță, calciul activează nu numai mișcarea (contracția) ci majoritatea celorlalte procese celulare. Ca^{2+} este de fapt mesagerul de ordinul II predominant în toate procesele celulare.

Întrebarea următoare este: de unde provine calciul necesar activării proceselor celulare? Prima sursă cunoscută este fluidul extracelular. De exemplu, în cazul neuronului, semnalul nervos care sosește la terminația sinaptică, scade diferența de voltaj transmembranară și are drept rezultat deschiderea canalelor de calciu (sensibile la schimbările de voltaj) din membranele presinaptice. Înainte de depolarizare, concentrația intraneuronală a calciului este de circa 1×10^{-7} molar (ceea ce corespunde cu circa 6×10^{14} ioni de Ca^{2+} pe centilitru de citoplasmă). Concentrația calciului din spațiul extracelular este cu cca patru ordine de mărime mai mare (adică de circa $1 \geqslant \geqslant 10^{-3}$ molar).

Scanned with OKEN Scanner

Calciul extracelular nu este singura sursă de ioni de calciu din celulă; așa de exemplu (după cum au dovedit cercetările întreprinse la Catedra de histologie a I.M.F. din București) există și surse intracelulare ca: aparatul Golgi, reticulul endoplasmic neted, mitocondriile și citoscheletul neurilemei (datorită calmodulinei acumulate de rețeaua de spectrină). Mai trebuie precizat că neurotransmițătorii și factorii de creștere acționează în final asupra țintelor lor, prin intermediul Ca^{2+} ca mesager de ordinul II.

9.8.2.1.2. Fosforilarea proteinelor neuronale

Fosforilarea și defosforilarea proteinelor intracelulare este consecința acțiunii unor *agenți reglatori* la suprafața celulelor.

O listă a *agenților reglatori* al căror efect direct sau indirect asupra activităților celulare este determinat de atașarea grupărilor fosfat la moleculele proteice, include numeroși hormoni, factorii de creștere și neurotransmițătorii care transmit semnalele chimice între celulele nervoase sau între acestea și celulele efectoare (musculare, glandulare etc.).

Pentru unii dintre acești agenți reglatori, calea prin care fosforilarea duce la obținerea răspunsului biologic este clară. Exemplul clasic îl constituie ruperea moleculelor de glicogen intracitoplasmic ca urmare a acțiunii hormonului epinefrinic. Legarea hormonului de receptorul de la suprafața celulelor declanșează un lanț de procese intracitoplasmice, care culminează cu fosforilarea, ca urmare a activării enzimei denumită *fosforilază*. Fosforilarea rupe glucoza stocată sub formă de incluziuni de glicogen (în diferite tipuri de celule și îndeosebi în hepatocite, în celulele nervoase și în fibrele musculare) eliberînd molecule de glucoză care pot fi ușor transformate în energie utilizabilă de către celulă. Fosforilaza poate fi apoi inactivată prin captarea grupării fosfat de către o enzimă denumită protein-fosfatază.

Deși cercetările asupra fosforilazelor și a altor enzime asociate au stabilit că adăugarea sau detașarea radicalilor fosfat se află la baza activității enzimelor respective, rolul precis al proteinelor care se fosforilează ca răspuns la diverșii agenți reglatori se dovedește a fi foarte dificil de clarificat. Afirmația este valabilă îndeosebi pentru mecanismul de activare a factorilor de creștere și pentru cel al neurotransmițătorilor.

Acțiunea neurotransmițătorilor începe prin legarea lor de receptori specifici de pe suprafața celulei-țintă. Ulterior s-a dovedit că o consecință a legării neurotransmițătorilor (ca de exemplu a dopaminei, serotoninei sau norepinefrinei) la suprafața celulelor-țintă, este activarea kinazelor care atașează grupările fosfat la proteinele citoplasmice. Recent, s-au adus dovezi directe că efectele neurotransmițătorilor sînt mediate de kinaze și proteinele pe care acestea le fosforilează. Astfel, s-a constatat că injectînd într-o celulă o anumită kinază, se poate intensifica răspunsul unui neuron la neurotransmițător. În schimb, injecția unui inhibitor specific față de o anumită kinază previne răspunsul normal la neurotransmițătorul corespunzător. De asemenea, precizăm că neurotransmițătorii nu activează direct kinazele, ci acționează prin intermediul așa-zișilor mesageri de ordinul II sau mesageri (AMP intracelulari. Dintre mesagerii de acest ordin fac parte nucleotizii ciclici ciclic și GMP ciclic), ionul de calciu, calmodulina, diacilglicerolul și inozitoltrifosfatul (IP_3).

Scanned with OKEN Scanner

Proteinkinazele importante prin implicarea lor în acțiunea mesagerilor de ordinul al doilea sînt proteinkinazele tip I și II, dependente de AMP-ciclic (sau cAMP), care mai sînt denumite și kinazele A. Aceste proteinkinaze sînt alcătuite din două subunități, și anume: *a) subunitatea catalitică* (sau subunitatea C), care este în esență identică în ambele tipuri de enzime și care în forma liberă se află în faza solubilă, adică în citosol și *b) subunitatea reglatorie tip I* și respectiv *tip II* (sau R I și R II), care are pe de o parte rolul de proteină receptoare a cAMP și pe de altă parte, este capabilă de a lega proteinkinaza de anumite organite celulare, cum este cazul zonei trans a complexului Golgi, de regiunile bogate în neurotubuli (de exemplu, de dendrite) sau la nivelul centrilor de organizare a microtubulilor.

Subunitatea R II este o proteină reglatorie multifuncțională ce poate lega și alte proteine pe lîngă subunitatea C. Printre proteinele substrat ce pot fi legate de R II se află și proteina 2 asociată microtubulilor (MAP_2). MAP_2 este concentrată în neurotubulii din pericarioni și dendrite. Proteina R II leagă și alte proteine asociate microtubulilor în mod similar MAP_2-ului. MAP_2, și celelalte proteine substrat (pentru fosfokinaze) au peste 20 de locuri care pot fi fosforilate de subunitatea C (în 2—13 locuri) fiind capabile să se autofosforileze ca și complexul Ca^{2+}-calmodulină.

În consecință, cAMP are ca țintă pentru acțiunea sa reglatoare intraneuronală complexul de R I sau R II cu o varietate de proteine susceptibile pentru fosforilarea (cum este subunitatea C, MAP_2 și altele), putînd acționa asupra unei palete largi de procese biologice întocmai ca și complexul Ca^{2+}-calmodulină.

Cercetările de imunohistochimie au arătat că proteinkinazele dependente de cAMP sînt prezente în toate tipurile de celule din sistemul nervos central (neuroni și nevroglii) și că în diferite populații de neuroni, concentrația sa variază. De asemenea, s-a dovedit că ele nu sînt distribuite omogen în citoplasma neuronală, ci concentrate în anumite regiuni ale complexului Golgi, în unele zone bogate în microtubuli (ca în dendrite și în corpul unor neuroni), precum și în centrii de organizare a microtubulilor (în centrozomi și în corpusculii bazali ai cililor).

Implicarea cAMP în funcția microtubulilor a fost sugerată de mai multă vreme; datele prezentate mai sus permit aprofundarea mecanismelor moleculare care controlează legarea unor organite de microtubuli cu ajutorul unor proteine capabile de fosforilare prin intermediul complexului proteinkinazelor dependente de cAMP. Aceasta constituie o cale eficientă pentru reglarea transportului intracelular în lungul neurotubulilor. De asemenea, diversitatea de proteine capabile să se lege de complexul fosfokinazelor dependente de cAMP, permite concentrarea acestei enzime în locuri de mare importanță pentru fiziologia celulară. Așa este cazul zonei Golgi-centrozom. Această zonă are un rol-cheie în polaritatea celulară, în motilitatea și în transportul veziculelor. Cel puțin în unele condiții cAMP controlează aceste procese pe calea proteinkinazei.

O atenție specială merită *proteinkinaza tip II dependentă de Ca^{2+}/calmodulină* sau *kinaza II CaM* care este cea mai abundentă proteinkinază din creier (circa 1% din totalul proteinelor cerebrale). Ea are o localizare strategică pentru a putea răspunde atît semnalelor de Ca^{2+} pre- și postsinaptice ge-

Scanned with OKEN Scanner

nerate de activitatea electrică, cît și transmițătorilor extracelulari și hormonali. Această kinază face parte dintr-o familie de kinaze omologe, cu un larg substrat de specificitate; este o proteină mare, multinumerică, de 300—700 kD, compusă din subunități (de 50—60 kD), care leagă calmodulina și care se autofosforilează în prezența Ca^{2+} și a calmodulinei. Cele mai importante proteine fosforilate de către kinaza II CaM sînt proteinele membranelor veziculelor sinaptice, și anume sinapsina I, proteina 2 asociată microtubulilor (MAP_2), precum și subunitățile proprii aflate în densitățile postsinaptice. De asemenea proteine cu greutate moleculară ca aceea a subunităților proprii, pot fi fosforilate în sinaptozomii care au fost depolarizați în prezența calciului. Kinaza II CaM acționează ca un schimbător molecular declanșat de calciu, capabil să se autofosforileze și să se defosforileze. Defosforilarea subunității kinazice se realizează prin fosfataza 1, prezentă în citosol și în fracțiunea joncțiunii sinaptice și prin fosfataza 2 A din citosol. În plus, kinaza își poate prelungi activitatea o anumită perioadă, după ce a primit semnalul inițial de calciu, deoarece poate capta 3—12 grupări fosfat. Prin capacitatea de autofosforilare prelungită, kinaza II CaM este implicată în controlul plasticității activității sinaptice.

9.8.2.1.3. Sistemul kinază CaM/fosfatază

Sistemul kinază CaM/fosfatază își schimbă, în cursul activității sale funcționale, conformația moleculară sub acțiunea Ca^{2+}. În *stadiul 1*, cînd kinaza nu este fosforilată, o creștere trecătoare a concentrației calciului declanșează inițial o activare bruscă a kinazei, urmată apoi de autofosforilare (în acest stadiu fosforilarea sinapsinei I, a MAP_2 și a altor proteine, precum și autofosforilarea CaM/Ca^{2+} sînt dependente de creșterea concentrației calciului intracelular). În cazul cînd concentrația Ca^{2+} rămîne crescută suficient timp pentru a permite desfășurarea autofosforilării pînă la un nivel limită, este indusă trecerea sistemului în *stadiul 2*. În stadiul 2, activitatea kinazei va continua și după ce concentrația calciului va scădea la nivelul inițial, de repaus. În acest stadiu activitatea kinazei continuă la un nivel de circa 20% (față de kinaza stimulată de calciu în stadiul 1) și autofosforilarea este relativ refractară față de stimulii de Ca^{2+}. Revenirea la stadiul 1 necesită intervenția protein-fosfatazei. Autofosforilarea independentă de calciu din stadiul 2, care însoțește celelalte schimbări ale activității kinazice (ca autofosforilarea sinapsinei I, MAP_2 și a altor proteine) este refractară la acțiunea defosforilantă a fosfatazelor. Durata stadiului 2 este determinată de balanța dintre nivelul autofosforilării independentă de calciu și nivelul activității defosforilante a fosfatazelor. Dacă nivelul autofosforilării depășește nivelul defosforilării, stadiul 2 persistă un timp egal cu durata de viață a enzimei. Măsurarea activității fosfatazice din *hippocampus* și din creierul anterior sugerează că o asemenea situație există în regiunile respective cerebrale, deoarece aici kinaza tip II CaM prezintă cea mai mare concentrație.

În concluzie, în sistemul nervos, mecanismul de schimbare a conformației moleculare a sistemelor enzimatice de tipul kinazină CaM/fosfatază, ca urmare a unor activități repetate ca stimularea îndelungată, stimularea posttetanică sau o excitație puternică, pot fi implicate în plasticitatea sinap-

Scanned with OKEN Scanner

tică. Dovezile aduse în ceea ce privește participarea kinazei tip II CaM în eliberarea reglării neurotransmițătorilor sînt în concordanță cu această posibilitate. În plus, trebuie remarcat că proteinkinaza este concentrată în acele regiuni cerebrale în care este pronunțată elasticitatea sinaptică de lungă durată.

Accentuăm că numărul de mesageri de ordinul II și de neurotransmițători care acționează asupra proteinkinazelor neuronale este relativ restrîns.

9.8.2.1.4. Factorul de creștere nervos și fosforilazele

În ultimii ani s-a demonstrat că NGF este necesar pentru supraviețuirea *in vitro* a celulelor precursoare cromafine ale medulosuprarenalei și pentru diferențierea neuronilor sistemului nervos central. De asemenea NGF stimulează *in vitro* transformarea în neuroni simpatici a celulelor PC 12 (celule clonale derivate din feocromocitomul de șobolan). Diferențierea neuronală indusă de NGF este însoțită de un mare număr de schimbări morfologice și biochimice. Unele dintre acestea includ extinderea prelungirilor nervoase, creșterea activității enzimelor care sintetizează neurotransmițători, stabilirea potențialului de acțiune pe bază de Na^+ și scăderea diviziunilor celulare. Pentru a se înțelege bazele moleculare ale acțiunii NGF asupra diferențierii celulelor nervoase, au fost luate în considerație mai multe ipoteze. Acestea includ metilarea fosfolipidelor sau a fosfoproteinelor, *turnover*-ul fosfatidilinozitolului, creșterea cAMP și mobilizarea Ca^{2+} intracelular. Întîi s-a raportat o inducere specifică a numărului de proteine fosforilate, ca urmare a tratării celulelor PC 12 cu mici cantități de NGF. Analiza cantității totale a proteinelor fosforilate și îndeosebi inducerea fosforilării proteinelor neuronale S6 de către diferiți agenți, sugerează că NGF activează proteinkinaza dependentă de cAMP. NGF, ca și alți factori, stimulează fosforilarea unei alte proteine și anume a *tirozin-hidroxilazei* — enzima care controlează biosinteza catecolaminelor. Inducerea fosforilării tirozinhidroxilazei de către NGF are drept consecință activarea enzimei.

Tirozinhidroxilaza conține cel puțin patru locuri susceptibile de fosforilare. Activarea și inhibarea diferențiată de către proteinkinaza dependentă de Ca^{2+}/fosfolipide și de către proteinkinaza dependentă de cAMP, au permis să se dovedească că inducerea fosforilării tirozinhidroxilazei de către NGF este mediată independent de cele două kinaze.

NGF mediază fosforilarea mai multor proteine neuronale în mod rapid și reversibil. Una dintre aceste proteine, tirozinhidroxilaza, este o proteină care se poate fosforila ca răspuns la diferiți agenți, într-un anumit loc din cele patru locuri de fosforilare. Fosforilarea tirozinhidroxilazei indusă de NGF se efectuează prin intermediul a două kinaze diferite, fapt clar dovedit prin capacitatea NGF de a fosforila în mod specific și independent două fragmente diferite ale moleculei de fosfokinază, și anume T_1 și T_3.

Fosforilarea tirozinhidroxilazei la nivelul agentului T_3 al peptidei este mediată de NGF prin intermediul proteinkinazei dependentă de Ca^{2+}/fosfolipide (sau kinaza C). Tratarea neuronilor simpatici și a celulelor cu PC 12 cu NGF provoacă intensificarea *turnover*-ului fosfatidilinozitolului și deci acumularea diacilglicerolului care activează kinaza C.

Scanned with OKEN Scanner

Tratarea celulelor nervoase cultivate *in vitro* cu NGF stimulează activitatea proteinkinazei dependentă de cAMP. Această concluzie se întemeiază pe mai multe dovezi. NGF și creșterea concentrației de cAMP au drept consecință fosforilarea tirozinhidroxilazei la nivelul segmentului T_1 al polipeptidei. Fosforilarea în T_1 a tirozinhidroxilazei, ca răspuns la prezența NGF, survine și în cazul cînd în mediu se află inhibitori ai kinazei C. Totodată creșterea activității proteinkinazei dependente de cAMP conduce indirect și la activarea kinazei C (dacă nu sînt prezenți inhibitori ai acesteia).

Mai trebuie adăugat că cercetările *in vivo* și *in vitro* arată că tirozinhidroxilaza este fosforilată și de proteinkinaza dependentă de Ca^{2+}/calmodulină. Spre deosebire însă de celelalte două sisteme proteinkinazice susmenționate, kinaza CaM acționează asupra segmentului peptidic T_2 al tirozinhidroxilazei și acțiunea sa este independentă de NGF, dar dependentă de segmentul 3 (fragmentul care leagă heparina) al moleculei de laminină.

În concluzie NGF poate activa kinaza C pe două căi distincte dar convergente. Ambele căi implică creșterea *turnover*-ului fosfatidilinozitolului — una mai direct, prin interacțiunea receptorului pentru HGF cu proteina G, iar cea de a doua indirect, prin activarea proteinkinazei dependentă de cAMP. Efectul activării kinazei C constă în fosforilarea proteinelor substrat, cum este cazul tirozinhidroxilazei (în punctul T_3) și al altor proteine neuronale. De asemenea NGF stimulează proteinkinaza dependentă de cAMP, care determină, la rîndul său, fosforilarea proteinelor substrat ca tirozinhidroxilaza (în punctul T_1), proteina ribozomală S6 și alte proteine neuronale.

În continuare, se pune întrebarea: care este consecința celulară a activării celor două sisteme kinazice de către NGF? În primul rînd se dovedește că două kinaze principale converg în fosforilarea (în două locuri diferite) unui substrat comun, tirozinhidroxilaza, care are un rol deosebit de important în creșterea sintezei catecolaminelor. De asemenea aceste kinaze pot media și alte acțiuni ale NGF, ca inducerea sintezei altor enzime și proteine. Astfel s-a sugerat că inducția proto-oncogenei *fos* de către NGF survine pe calea activării kinazei C. De asemenea inducerea ornitindecarboxilazei de către NGF survine prin intermediul activării proteinkinazei dependente de cAMP, precum și prin kinaza C. Principalele modificări morfologice induse de NGF sînt extinderea prelungirilor neuronale. Creșterea mobilizării cAMP și Ca^{2+} a fost de asemenea indicată ca o modificare importantă indusă de NGF în cursul creșterii neuriților, probabil ca urmare a stimulării *turnover*-ului fosfatidilinozitolului. S-a dovedit de asemenea că extinderea neuronilor, ca urmare a acțiunii NGF, este urmată de fosforilarea vinculinei și de repartiția punctelor de adeziune focală. În sfîrșit, stimularea fosforilării ca răspuns al NGF este consecința nu numai a activării kinazelor dependente de cAMP și a kinazei C, ci și a activării unei a treia kinaze, care fosforilează proteine de 230 kD (adică MAP_3) din citoschelet.

9.8.2.1.5. Biologia unor fosfoproteine

După cum s-a menționat la matricea neuronală, în prezent este mai bine cunoscută biologia a două fosfoproteine nervoase, și anume sinapsina și DARPP-32.

Scanned with OKEN Scanner

S-a dovedit că există o corelație între activitatea celulei nervoase, eliberarea neurotransmițătorului și fosforilarea *sinapsinei*. În acest scop s-a injectat în anumite terminații axonale fie sinapsina I, fie kinaza — activată de calciu (care fosforilează sinapsina). Astfel s-a dovedit că sinapsina I nefosforilată inhibă descărcarea neurotransmițătorilor, în timp ce kinaza potențează eliberarea acestora. Mai mult, s-a putut arăta că sinapsina I se disociază în veziculele sinaptice atunci cînd este fosforilată de către kinază + calciu. Pe baza acestor cercetări se pot face următoarele considerații: *a)* sinapsina I în stadiul nefosforilat formează o capsulă în jurul veziculelor sinaptice; *b)* atunci cînd un neuron primește un stimul corespunzător, concentrația intrasinaptică a calciului crește și kinaza este activată; *c)* kinaza fosforilează la rîndul său sinapsina I (care se disociază de pe suprafața veziculelor sinaptice) și are drept consecință creșterea capacității veziculelor de a fuziona cu membrana presinaptică, deci de a descărca neurotransmițătorii.

Repartiția *DARPP-32* este mai restrînsă decît cea a sinapsinei I. DARPP-32 este prezentă îndeosebi în unii neuroni care răspund la dopamină. Acest neurotransmițător se leagă la două tipuri de receptori cunoscuți ca receptori D_1 și D_2. DARPP-32 se află numai în neuronii cu receptori D_1. Această fosfoproteină nu se întîlnește în celulele nervoase cu receptori D_2. Celulele care conțin DARPP-32 includ și neuronii spinoși de mărime medie din regiunea caudatoputamen a creierului, care se alterează la pacienții cu maladia Huntington. Aceiași neuroni sînt ținta celulelor dopaminergice care degenerează în maladia Parkinson.

Ca urmare a legării dopaminei de receptorul D_1, concentrația AMP-ciclic crește, rezultînd activarea kinazei dependentă de AMP-ciclic, care este enzima ce fosforilează DARPP-32. În timp ce sinapsina I participă la eliberarea neurotransmițătorilor din toți neuronii, DARPP-32 este implicată în primirea acestor semnale numai într-un grup restrîns de neuroni.

S-au sugerat următoarele mecanisme moleculare de lucru a DARPP-32: *a)* ca răspuns la acțiunea dopaminei, kinaza dependentă de AMP-ciclic fosforilează mai multe proteine, inclusiv DARPP-32; *b)* în forma sa fosforilată (nu însă și în cea nefosforilată) DARPP-32 este un inhibitor foarte eficient asupra proteinfosfatazei 1. Astfel, DARPP-32 fosforilată potențează acțiunea dopaminei, prin blocarea captării fosfaților de către alte fosfoproteine reglate de dopamină.

De asemenea, DARPP-32 constituie o cale de integrare a efectului dopaminei cu alți neurotransmițători. De exemplu, neuronii spinoși de talie mijlocie din regiunea caudatoputamen sînt inervați atît de neuroni dopaminergici (care vin din *substantia nigra)* cît și de neuroni glutaminergici (care vin din scoarța cerebrală). Glutamatul stimulează kinaza calciu-dependentă, acționînd asupra ionului de calciu ca al doilea mesager. DARPP-32 fosforilată inhibă preluarea grupării fosfat de către această kinază de la fosfoproteina substrat a acesteia. În acest fel DARPP-32 este responsabilă de capacitatea dopaminei de a potența efectul glutamatului. În consecință, inhibiția fosfatazei se dovedește a fi o componentă importantă a mecanismului molecular care stă la baza interacțiunii dintre neurotransmițători.

Scanned with OKEN Scanner